



Physiologie von *Pseudomonas aeruginosa* unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Nathalie Yvonne Rosin
geb. Rosner
aus Wolfenbüttel

1. Referent : Professor Dr. Dieter Jahn
2. Referent : Privatdozent Dr.-Ing. Max Schobert
eingereicht am : 22.12.2010
mündliche Prüfung (Disputation) am : 18.03.2011

Druckjahr 2011

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Tielen, P. , Narten, M., Rosin, N., Biegler, I., Haddad, I., Hogardt, M., Neubauer, R., Schobert, M., Wiehlmann, L., Jahn, D. (2011): Genotypic and phenotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from urinary tract infections. Int J Med Microbiol. Apr;301(4):282-92.

Tagungsbeiträge

Rosner, N., Wöhl, M., Narten, M., Wiehlmann, L., Hogardt, M., Schobert, M., Tielen, P., Jahn, D.: Phenotypic characterization of urinary tract isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. (Poster) VAAM Konferenz, Osnabrück, Deutschland (2007).

Rosner, N., Schobert, M., Tielen, P. : Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from urinary tract infections. (Poster) Summer School, Deutschland (2008).

Rosin, N., Zapf, K., Jänsch, L., Schomburg, D., Schobert, M., Tielen, P. : Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from urinary tract infections. (Poster) ASM Pseudomonas, Hannover, Deutschland (2009).

Rosin, N., Jänsch, L., Schobert, M., Tielen, P. : Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to urinary tract infections. (Vortrag) VAAM Konferenz, Hannover, Deutschland (2010).

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Harnwegsinfektionen	1
1.2	Biofilmbildung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
1.3	Charakterisierung von <i>P. aeruginosa</i>	5
1.4	Pathogenität von <i>P. aeruginosa</i>	6
1.5	Antibiotika-Resistenz von <i>P. aeruginosa</i>	9
1.6	Das Typ III Sekretionssystem	9
1.7	Der Transkriptionsfaktor SlyA und die MarR Familie von Transkriptionsregulatoren	11
1.8	Ziel der Arbeit	13
2	Material und Methoden	14
2.1	Chemikalien und Materialien	14
2.1.1	Nährmedien	14
2.1.2	Puffer und Lösungen	16
2.1.3	Bakterienstämme und Makrophagen	16
2.1.4	Oligonukleotide und Plasmide	19
2.1.5	Geräte	19
2.2	Mikrobiologische Methoden	21
2.2.1	Stammhaltung und Lagerung von Bakterien und Makrophagen	21
2.2.2	Wachstumsversuche mit planktonischen Kulturen	21
2.2.3	Wachstum von Biofilmen auf Membranfiltern	22
2.2.4	Bestimmung von Beweglichkeiten von <i>P. aeruginosa</i>	23
2.2.5	Nachweis von Virulenzfaktoren in <i>P. aeruginosa</i>	25
2.2.6	Quorum sensing Nachweise	26
2.2.7	Cytotoxizitätstest	28
2.2.8	Serogruppentypisierung	30
2.3	Biochemisch analytische Methoden	30
2.3.1	Bestimmung von Pyocyanin und Pyoverdin in <i>P. aeruginosa</i> Kulturen	30
2.3.2	Photometrische Enzymaktivitätstests	32

2.3.3	Quantitativer Nachweis von Uronsäuren	34
2.4	Molekularbiologische Methoden	35
2.4.1	Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen	35
2.4.2	Agarose-Gelelektrophorese	35
2.4.3	Grundlagen für die Isolation von RNA	35
2.4.4	Zellernte für die RNA-Isolierung	35
2.4.5	RNA-Präparation	36
2.4.6	RNA Aufreinigung und Qualitätskontrolle	37
2.4.7	Reverse Transkription (cDNA Synthese)	39
2.4.8	Probenpräparation für <i>Affymetrix GeneChip</i>	40
2.4.9	Quantitative Real-Time PCR	41
2.4.10	Kolonie-PCR	43
2.4.11	Mini-Präparation von Plasmid-DNA	44
2.4.12	Isolierung von genomischer DNA aus <i>P. aeruginosa</i>	45
3	Ergebnisse und Diskussion	47
3.1	Simulierung von Harnwegsinfektionen	47
3.1.1	Planktonisches Wachstum von <i>P. aeruginosa</i> unter aeroben Bedingungen	47
3.1.2	Aerobes Wachstum von <i>P. aeruginosa</i> im Koloniebiofilm	49
3.1.3	Anaerobes Wachstum von <i>P. aeruginosa</i> im Koloniebiofilm-Anzuchtssystem	52
3.2	Physiologie von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 und PA14 unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen	53
3.2.1	Transkriptom von <i>P. aeruginosa</i> unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen	53
3.2.2	Quorum sensing Aktivität von <i>P. aeruginosa</i> unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen	67
3.2.3	Aktivität extrazellulärer Enzyme	69
3.2.4	Bestimmung von Uronsäuren in <i>P. aeruginosa</i> Biofilmen	70
3.3	Charakterisierung klinischer <i>P. aeruginosa</i> Isolate	71
3.3.1	Serotypisierung von klinischen Harnwegsisolaten	71
3.3.2	Quorum Sensing Aktivität von klinischen <i>P. aeruginosa</i> Harnwegsisolaten	73
3.3.3	Die Exoenzyme ExoS und ExoU	75
3.3.4	Cytotoxizitätstest unter infektiionsrelevanten Bedingungen	77

3.3.5	Wachstumsverhalten klinischer Isolate	79
3.4	Sequenzierung der Genome von zwei klinischen <i>P. aeruginosa</i> Harnweg- isolaten	80
3.5	Funktionsbestimmung des Transkriptions-regulators SlyA aus <i>P. aeru- ginosa</i>	85
3.5.1	Genexpression von <i>slyA</i>	85
3.5.2	SlyA-abhängige Expression von <i>exoS</i> und <i>exoU</i>	87
3.5.3	Temperaturabhängige Aktivität von ExoU und ExoS	89
3.5.4	Charakterisierung der Mobilität verschiedener uropathogener <i>P. aeruginosa</i> Stämme	94
3.5.5	Bestimmung des SlyA Regulons in <i>P. aeruginosa</i> PAO1	96
4	Zusammenfassung	103
5	Ausblick	104
	Abbildungsverzeichnis	106
	Tabellenverzeichnis	108
	Literaturverzeichnis	111
A	Anhang	135
A.1	Transkriptom-Tabellen	135
	Internetadressen	158
	Danksagung	159

1 Einleitung

1.1 Harnwegsinfektionen

Unter einer Harnwegsinfektion versteht man eine entzündliche Erkrankung der oberen bzw. unteren Harnwege, die vor allem durch bakterielle Infektionen (zu 70 % von *Enterobacteriaceae*) ausgelöst wird (Pschyrembel, 2004). Der Harnweg ist aus mehreren Komponenten zusammengesetzt (siehe Abbildung 1), beginnend mit der linken und der rechten Niere (Harnbereiter), die mit Hilfe der Nephronen (ca. 1 Mio pro Niere) Abfallstoffe aus dem Blut filtern. Pro Minute wird ca. 1 l Blut über die Nierenarterie zu den Nieren befördert und dort gefiltert, was über den Tag 1500 l gefiltertes Blut ergibt. Die Abfallstoffe werden über das Nierenbecken (Beginn des ableitenden Harnwegs) zusammen mit Wasser als Urin abgesondert. Die Zusammensetzung des Urins ist tageszeit- und diätabhängig und besteht aus folgenden Hauptkomponenten: Wasser (95 % des Gesamtvolumens), Harnstoff (Endprodukt des Eiweißstoffwechsels, etwa 20-25 g/Tag), Harnsäure (Abbauprodukt der Purine, etwa 0,5-1,0 g/Tag), Kreatinin (Endprodukt des Muskelstoffwechsels und aus der Nahrung, etwa 1,2-1,8 g/Tag), Aminosäuren (etwa 800 mg/Tag), Salze (etwa 10 g/Tag, insbesondere NaCl), Phosphate und organische Säuren wie Oxalsäure und Zitronensäure (in unterschiedlichen Mengen) sowie D-Glukose in geringen Mengen (etwa 70 mg/Tag). Seine Farbe erhält der Urin von gelben, stickstoffhaltigen Urochromen (Thudichum, 1864). Sie entstehen beim Abbau von Eiweißen und Bilirubin (Gallenbestandteil). Es wird über Zwischenstufen zu Urobilin abgebaut, welches eine orangegelbe Färbung aufweist (Jones-Lepp, 2006).

Sein pH-Wert liegt zwischen 5 und 7. Der Urin gelangt in die Harnleiter, durch die er bis zur Harnblase weitergeleitet wird. In der Blase angekommen wird bis zu 1 l des Urins gelagert, bis er über die Harnröhre aus dem Körper ausgeschieden wird (Netter und Renner, 1983, Brandes und Schönberger, 1995, Egberts und Soederhuizen, 1996, Brooks und Keevil, 1997, Pschyrembel, 2004).

Harnwegsinfektionen werden durch Katheter begünstigt, wobei die Art des Katheters eine wichtige Rolle spielt. Bei offenen Systemen (offener Urin Sammelbehälter) stellt sich die Infektion für gewöhnlich bereits nach vier Tagen ein. Bei geschlossenen Systemen (mit einem verschlossenen Plastikbeutel als Auffangbehälter) kann der Ka-

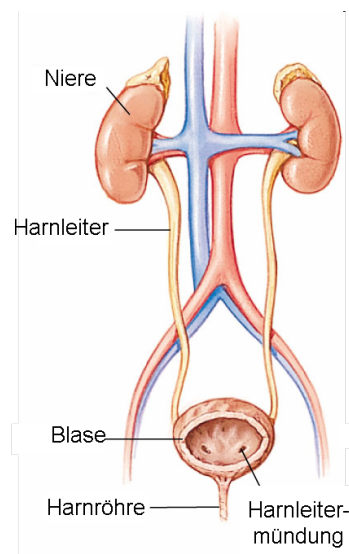


Abbildung 1: Darstellung des menschlichen Harntrakts, bestehend aus Nieren, Harnleitern, Blase und Harnröhre. Quelle: www.stefajir.cz

theter zwischen 10 und 14 Tagen steril bleiben (Donlan und Costerton, 2002). Generell ist bei Kurzzeit-Kathetern (bis sieben Tage) das Risiko einer Infektion mit 10-50 % wesentlich geringer als bei Langzeit-Kathetern (über 28 Tage), bei denen beinahe alle Patienten eine Infektion erleiden (Stickler, 1996). Hierbei nutzen die Bakterien die durch den Urin konditionierte Oberfläche des Katheters als Anheftungsgrund, an dem sie sich entlang bewegen und einen großflächigen Biofilm ausbilden (Nickel *et al.*, 1992), der auch durch das antimikrobielle Triclosan nicht inhibiert wird (Jones *et al.*, 2006). Zur Anheftung an Oberflächen bzw. Epithelzellen dienen *Pseudomonas aeruginosa* die zur Fortbewegung genutzten Flagellen und Typ IV Pili (O'Toole und Kolter, 1998).

Die häufigste Art der Harnwegsinfektion betrifft den unteren Harntrakt, also den Harnleiter und die Blase, und wird allgemein als Blasenentzündung bezeichnet. Die dabei auftretenden Symptome sind schmerzvolles Urinieren mit verstärkter Häufigkeit und Dringlichkeit. Zudem leidet der Patient aufgrund der Infektion häufig unter Fieber. Im Urin von Patienten ist eine Bakterienzellzahl von mehr als 10^5 Keimen/ml, ein erhöhter Proteingehalt, sowie Leukozyten und Erythrozyten zu finden (Pschyrembel, 2004).

Eine Blasenentzündung ist durch Antibiotikaeinnahme und vermehrte Flüssigkeitsaufnahme leicht zu behandeln. Wird die Behandlung nicht durchgeführt, kann sich die Infektion über die Harnleiter bis zu den Nierenbecken ausbreiten und verheerenden Schaden im Harnweg anrichten, der bis zum Tod des Patienten durch Sepsis führen kann (Brandes und Schönberger, 1995, Kilmartin, 2002). Bis zu 90 % aller bakteriellen

Harnwegsinfektionen sind ascendierend, wobei die Bakterien von außen in die Harnröhre gelangen und bis zur Blase aufsteigen (Pschyrembel, 2004). Auch Pilze und Viren können Auslöser für eine Harnwegsinfektion sein.

Der häufigste Keim in Harnwegsinfektionen ist *Escherichia coli* mit 80-90 % der Fälle (Moore *et al.*, 2002, Shigemura *et al.*, 2006). In komplizierten Harnwegsinfektionen macht *E. coli* jedoch nur etwa 20 % der Fälle aus, während andere Mikroorganismen wie *P. aeruginosa* eine größere Rolle spielen (Moore *et al.*, 2002). Bei Patienten mit Langzeit-Kathetern macht *P. aeruginosa* sogar etwa 35 % der komplizierten Harnwegsinfektionen aus (Ronald, 2002). Die vielseitigen Eigenschaften von *P. aeruginosa* Harnwegsentzündungs-Isolaten wurden von Woods *et al.*, 1986 und Mittal *et al.*, 2006 bereits untersucht und beschrieben.

1.2 Biofilmbildung von *Pseudomonas aeruginosa*

Unter einem Biofilm versteht man an einer Oberfläche haftende Bakterien, die von einer hydratisierten Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen umschlossen werden (Costerton *et al.*, 1999, Donlan und Costerton, 2002). Ein lebender, hydratisierter Biofilm besteht zu etwa 98 % aus Wasser. Die restlichen 2 % bestehen zu 15 % (v/v) aus Bakterienzellen und zu 85 % (v/v) aus Matrix-Materialien (Donlan und Costerton, 2002). Eine solche Matrix kann neben Exopolysacchariden auch Proteine, Lipide und DNA beinhalten. Planktonische Bakterien bilden bevorzugt unter starken Scherkräften (Reynoldszahl über 5000) Biofilme an einer Oberfläche (Characklis, 1990). Diese Biofilme sind dauerhaft stabiler gegenüber mechanischer Beanspruchung als Biofilme, die unter geringen Scherkräften gebildet wurden (Characklis, 1990).

Biofilme, die von gramnegativen Organismen ausgebildet werden, können, je nach Nährstoffangebot und Strömungsverhältnissen, unterschiedliche Strukturen ausbilden, wobei eine mögliche Struktur pilzförmig ist. Die Entstehung von Biofilmen gliedert sich in 5 dynamische Phasen, die in Abbildung 2 (Ghigo, 2003) veranschaulicht sind.

[1] Die Bakterien adhärieren zunächst reversibel, über Flagellen und Typ IV Pili vermittelt, an der zu besiedelnden Oberfläche. Es beginnt die Produktion von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS). Die irreversible Anheftung [2] der Bakterien sowie die Bildung von Mikrokolonien, die durch vermehrtes Zellwachstum entstehen, sind die Folge [3]. Die Produktion von Makromolekülen wird erhöht, der Biofilm reift heran [4] und bildet seine dreidimensionale Struktur aus. Teile des reifen Biofilms, oder

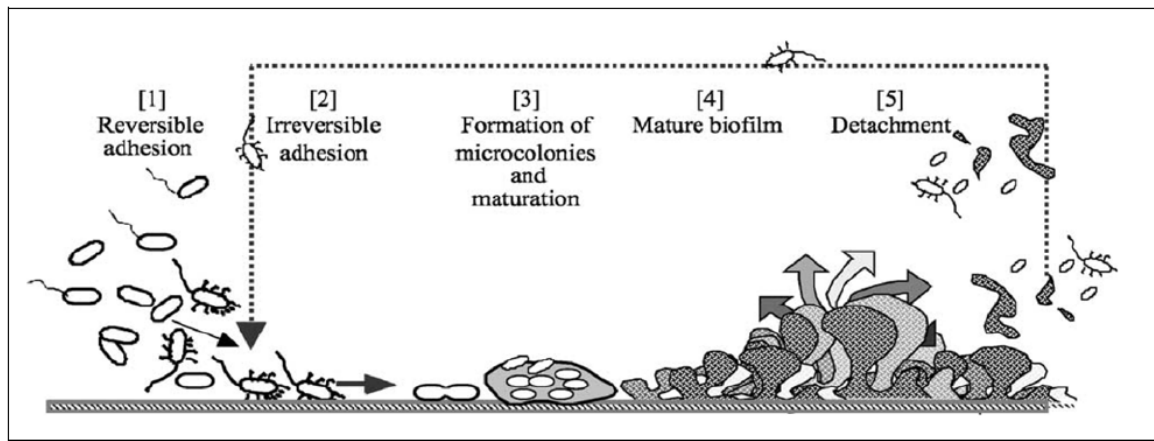


Abbildung 2: Die 5 Phasen der Biofilmbildung Gram-negativer Bakterien. Gezeigt sind die reversible Anheftung (Phase 1), irreversible Anheftung (Phase 2), Reifung und Bildung von Mikrokolonien (Phase 3), gereifter Biofilm (Phase 4) und Ablösung einzelner Bestandteile des Biofilms (Phase 5) (Ghigo, 2003).

auch einzelne Zellen, können sich ablösen und an anderer Stelle auf einer Oberfläche mit der Bildung eines neuen Biofilms beginnen [5].

Der Biofilm stellt eine dreidimensionale Struktur dar, die von kleinen Wasserkanälen durchzogen wird. Sie ermöglichen die Versorgung der Kolonien mit Nährstoffen und Sauerstoff von außen, aber auch den Abtransport von Stoffwechselprodukten. In einem Biofilm entsteht ein Gradient von Nährstoffen, Salzen und auch Sauerstoff, was zu mikroaeroben bis anaeroben Verhältnissen im Innern des Biofilms führt (Ghigo, 2003). Zudem wurde beschrieben, dass etwa 1 % der Zellen im Biofilm Persisterzellen sind, bekannt dafür, multiple Toleranzen gegen Agenzien wie Antibiotika zu besitzen. Sie sind bereits vor einer Antibiotika Behandlung Teil der Gemeinschaft und somit keine Folge derselben (Shah *et al.*, 2006, Lewis, 2001).

Weiterhin können die im Biofilm durch den Nährstoffgradienten entstehenden limitierten Regionen in einem stationärphase-ähnlichen „Schlaf“ der Bakterien resultieren, was möglicherweise der eigentliche Grund für die hohe Resistenz von Biofilmen gegenüber Antibiotika ist (Walters *et al.*, 2003, Fux *et al.*, 2004). Die verlangsamte Antibiotikadiffusion würde dann eher eine untergeordnete Rolle spielen, da der Stoffwechsel der Zellen auf ein Minimum heruntergefahren vorliegt und so die Wirkorte der Antibiotika inaktiv sind (Stewart und Costerton, 2001, Borriello *et al.*, 2004, Borriello *et al.*, 2006, Shah *et al.*, 2006). Als zusätzliche Resistenzmechanismen wären zudem die unterschiedliche Wachstumsrate (Anwar *et al.*, 1992), sowie weitere physiologische Verän-

derungen wie die Produktion von Sigmafaktoren, der Bakterien (Adams und McLean, 1999) denkbar (Donlan und Costerton, 2002).

Es wurde postuliert, dass Biofilmwachstum in 65 % aller bakteriellen Infektionen auftritt und besonders bei chronischen Infektionen und der Besiedlung von Kathetern eine wichtige Rolle spielt. Da vor einer Infektion mit einer Bakterienspezies oft eine harmlose Besiedlung steht, und erst durch die Ausbildung eines Biofilms die Infektionstypischen Immunantworten ausgelöst werden, kann die Biofilmbildung als Virulenzfaktor, nicht mehr nur als Persistenzfaktor, betrachtet werden (Hall-Stoodley und Stoodley, 2009). Das Leben im Biofilm schützt die Bakterienzellen vor Antibiotika (Nickel *et al.*, 1985, Kwon und Lu, 2006), aber auch vor Austrocknung, starken Salzbelastungen oder auch pH-Wertschwankungen. Zudem sind die Bakterienzellen im Biofilm durch die Exopolymerschicht vor dem Immunsystem des Wirtes geschützt, da Makrophagen und Antikörper nicht an die Bakterienzellen gelangen können (Schwarzmann und Boring, 1971, Leid *et al.*, 2005, Donlan und Costerton, 2002).

1.3 Charakterisierung von *P. aeruginosa*

P. aeruginosa ist ein opportunistisches Pflanzen- und Tier-Pathogen. Zu seinen Habitaten zählen sowohl terrestrische als auch aquatische Standorte, in denen es ubiquitär vertreten ist. Das Gram-negative, stäbchenförmige, nicht-Sporen-bildende und monotrich polar begeißelte γ -Proteobakterium (Brock *et al.*, 2003) besitzt einen hohen GC-Gehalt von 68 % und ist fakultativ anaerob. Auf Standardnährmedien kann *P. aeruginosa* 6 unterschiedliche Kolonietypen ausbilden: coliformen-ähnlich, klassisch, rauh, runzelig, mucoid und winzig (Phillips, 1969). Charakteristisch ist außerdem die Bildung des süßlich-aromatischen Duftstoffs Ortho-Aminoacetophenon (Mann, 1966), sowie die Ausbildung von wasserlöslichen Pigmenten, wie dem Pyoverdin (sogenanntes Fluorescein) und dem Phenanzinderivat Pyocyanin (Meyer und Hornspreger, 1978, Lau *et al.*, 2004). Das 6,3 Millionen Basenpaare umfassende Genom von *P. aeruginosa* PAO1 wurde von Stover *et al.*, 2000 vollständig sequenziert und umfasst 5570 annotierte Gene. Die hohe Anzahl an Genen unterstreicht die Anpassungsfähigkeit von *P. aeruginosa* an unterschiedliche Habitate und Umweltbedingungen. So kann *P. aeruginosa* als mesophiles Bakterium mit einer Generationszeit von 20 Minuten bei 37 °C in Vollmedium wachsen und besitzt die Fähigkeit, sich an Temperaturen bis zu 42 °C anzupassen. Zudem kann es viele unterschiedliche Kohlenstoffquellen wie Alkohole, Fettsäuren, Zucker, Di- und Tricarbonsäuren, Amine und Aminosäuren, aber auch

aromatische Verbindungen nutzen (Frimmersdorf *et al.*, 2010). Zum Glukoseabbau verwendet *P. aeruginosa* den Entner-Doudoroff-Weg (Entner und Doudoroff, 1952). Als bevorzugte Energiequellen gelten organische Säuren, wie Zwischenprodukte aus dem Citratzyklus (Brock *et al.*, 2003).

Sowohl in der Umwelt, als auch während einer Infektion befindet sich *P. aeruginosa* häufig in einem mikroaeroben bis anaeroben Habitat. Unter anaeroben Bedingungen kann *P. aeruginosa* mittels Denitrifikation (Nitratatmung) Energie gewinnen und an Stelle von Sauerstoff Nitrat oder Nitrit als terminalen Elektronenakzeptor verwenden (Zumft, 1997, Schreiber *et al.*, 2007). Sind diese nicht vorhanden, so kann *P. aeruginosa* ebenfalls durch Arginin- oder Pyruvat-Fermentation wachsen bzw. überleben (Eschbach *et al.*, 2004, Wu *et al.*, 2005). *P. aeruginosa* Infektionen sind schwer zu behandeln, da das Bakterium einerseits sehr anpassungsfähig ist und andererseits eine hohe intrinsische Resistenz gegenüber Desinfektionsmitteln und Antibiotika aufweist. Eine weitere wichtige Eigenschaft von *P. aeruginosa*, um sowohl in der Umwelt als auch während einer Infektion verschiedene Stressbedingungen zu überstehen, stellt das Biofilmwachstum dar (Hall-Stoodley und Stoodley, 2009).

1.4 Pathogenität von *P. aeruginosa*

P. aeruginosa kann als opportunistischer Erreger in immungeschwächten Menschen, wie z. B. Krebs- und AIDS-Patienten, sowohl akute als auch chronische Infektionen hervorrufen (Bodey *et al.*, 1983). Patienten mit der Erbkrankheit Mukoviszidose (Cystische Fibrose, CF) leiden an chronischen Lungenentzündungen, bei denen *P. aeruginosa* im Laufe der Zeit zum dominierenden Keim wird (Sadikot *et al.*, 2005). Weiterhin ist das Bakterium in der Lage, (unter geeigneten Bedingungen) Infektionen in der Lunge, im Mittelohr, der Bindehaut des Auges, in Wunden von Brandopfern, aber auch im Harnweg auszulösen (Evans *et al.*, 1998, Mittal *et al.*, 2006). Es ist einer der führenden gramnegativen Erreger in nosokomialen Infektionen. Da er auch Trinkwasserleitungen besiedelt, kann er zu einem hygienischen Problem in Krankenhäusern werden (Traub *et al.*, 1998, Obritsch *et al.*, 2005).

P. aeruginosa ist in der Lage, eine Reihe von Virulenzfaktoren auszubilden und sie über 6 verschiedene Sekretionssysteme in den extrazellulären Raum oder direkt in die Wirtszelle auszuschleusen (Typ I-III, V, VI und Membranvesikel, Ma *et al.*, 2003, Filloux *et al.*, 2008). Zu ihnen gehören extrazelluläre Enzyme wie die Lipasen A und C (LipA, LipC), aber auch die ADP-Ribosyltransferasen Exotoxin A (ExoA) und ExoS,

sowie die Phospholipase A (ExoU) (Yahr *et al.*, 1996). Exotoxin A wird von einer Vielzahl von klinischen *P. aeruginosa*-Stämmen produziert und hemmt die Proteinbiosynthese der Wirtszelle (Plotkowski *et al.*, 2002). ExoU und ExoS werden über das Typ III Sekretionssystem direkt in die Wirtszelle injiziert (Yahr *et al.*, 1996), wobei in der Regel nur eines der kodierenden Gene pro Bakterienzelle vorliegt (Feltman *et al.*, 2001). Auch vier Phospholipasen C (PlcH, PlcN, PlcB, PlcA), Phospholipase Leucocidin, Proteasen wie die alkalische Protease (AprA) und die Zink-Metalloprotease Elastase B (LasB), welche Elastin spalten kann, zählen zu den häufig vorhandenen Virulenzfaktoren, die *P. aeruginosa* in den extrazellulären Raum sezerniert (Döring, 1987, Vasil, 2005, Van Delden, 2004). Phospholipasen können sowohl über das Typ II Sekretionssystem, als auch über Membranvesikel aus der Bakterienzelle ausgeschleust werden (Tielen, 2005). Sie spalten Membranlipide in eukaryotischen Zellen und verursachen so schwere Gewebeschäden (Ostroff *et al.*, 1990). Die vorhandenen Proteasen werden ausschließlich über das Typ II Sekretionssystem sekretiert.

Neben den extrazellulären Enzymen kann *P. aeruginosa* weitere Virulenzfaktoren wie Rhamnolipide, die Pigmente Pyocyanin und Pyoverdin oder das Exopolysaccharid Alginate ausbilden. Pyoverdin gehört zu den Siderophoren und besitzt die Fähigkeit, dreiwertiges Eisen zu binden und für die Bakterienzelle als Fe^{2+} verfügbar zu machen (Upritchard *et al.*, 2007). Das Phenanzinderivat Pyocyanin löst in umliegenden Zellen oxidativen Stress aus, indem es durch Auto-Oxidation zur Freisetzung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und dem Superoxid O_2^- führt. Sich selbst schützt das Bakterium durch Enzyme wie Superoxid-Dismutase, Oxidase und Katalase, welche die Sauerstoff-Reduktionsprodukte detoxifizieren (Lau *et al.*, 2004).

Zur Kommunikation zwischen einzelnen Bakterienzellen besitzt *P. aeruginosa* die beiden hierarchisch angeordneten Quorum-Sensing (QS)-Systeme LasRI und RhlRI (Latifi *et al.*, 1996, McKnight *et al.*, 2000). Sie werden zelllichteabhängig aktiviert und regulieren etwa 300 der Virulenzfaktoren, wie z. B. LasB und die Rhamnolipidproduktion (Schuster *et al.*, 2003, Pesci und Iglewski, 1999). Dabei reguliert das LasRI System die Synthese von RhlRI (Latifi *et al.*, 1996). Zudem ist das *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS) ein wichtiger Regulator von Virulenzfaktoren und wird somit als Teil des QS Systems in *P. aeruginosa* beschrieben (Diggle *et al.*, 2006). Die Produktion von PQS ist Sauerstoff-abhängig, somit findet lediglich unter aeroben Bedingungen ein Einfluss von PQS auf die Produktion von Virulenzfaktoren statt (Schertzer *et al.*, 2010).

Um die Virulenzeigenschaften von *P. aeruginosa* in unterschiedlichen Infektionen auszumachen, wurden mehrere Studien an klinischen *P. aeruginosa* Isolaten durchgeführt. In Untersuchungen von Schaber *et al.* wurden 200 *P. aeruginosa*-Isolate aus chronischen Lungen- und Harnwegsinfektionen untersucht. Nur fünf der 200 Isolate wiesen ein defektes QS-System auf (Schaber *et al.*, 2007a). Es wurde gezeigt, dass die komplette Ausschaltung des QS-Apparates die Pathogenität und Resistenz der *P. aeruginosa*-Stämme herabsetzen kann (Bottomley *et al.*, 2007, Hentzer *et al.*, 2003). Weitere Ergebnisse zeigen, dass *P. aeruginosa* zur Biofilmbildung in einem Brandwunden-Mausmodell kein vollständiges QS-System benötigt. Die Virulenz der Bakterien ist aber durch die Defekte stark herabgesetzt (Schaber *et al.*, 2004, Schaber *et al.*, 2007a, Schaber *et al.*, 2007b). Daher werden stets Untersuchungen zu möglichen QS-Inhibitoren (z. B. Knoblauch, Triclosan) und deren Wirkung auf *P. aeruginosa* durchgeführt (Zhang, 2003, Bjarnsholt *et al.*, 2005, Rasmussen *et al.*, 2005).

Bei CF-Patienten wurde der mucoide Phänotyp als Kolonieform beobachtet (Van Delden, 2004, siehe auch Kapitel 1.3). Diese Kolonien produzieren besonders große Mengen des Exopolysaccharids Alginat, welches ebenfalls einen Virulenzfaktor von *P. aeruginosa* darstellt (Govan und Deretic, 1996). Zudem bietet es Schutz vor Austrocknung (Schwarzmann und Boring, 1971), dem Immunsystem des Wirtes (Pier *et al.*, 2001) und Antibiotika (Rehm und Winkler, 1996). So ist bekannt, dass Alginat in der Lage ist, Aminoglykoside zu binden, sodass es zu verzögerter Diffusion dieser im Biofilm kommt (Gordon *et al.*, 1988). Alginat bietet dem Bakterium zusätzlich einen gewissen Schutz gegenüber Wasserstoffperoxid (Schulte, 2003). Die ersten mucoiden *P. aeruginosa*-Isolate aus CF-Patienten wurden bereits 1966 beschrieben, jedoch weisen lediglich 1 % der *P. aeruginosa* Stämme aus anderen Infektionen, wie z. B. Harnwegsinfektionen, einen mucoiden Phänotyp auf (Doggett *et al.*, 1977, Govan, 1990, Tielen, 2005, Jain und Ohman, 2004).

1970 erfolgte die Charakterisierung von 227 *Pseudomonas*-Stämmen aus unterschiedlichen Infektionen, in der 90 morphologische und physiologische Merkmale untersucht wurden (Gilardi, 1970). 1986 wurden 132 *P. aeruginosa*-Stämme, allesamt Isolate aus Infektionen, phänotypisch analysiert und auf ihre Virulenzfaktoren hin untersucht (Woods *et al.*, 1986). Diese Charakterisierungen unterschiedlicher *P. aeruginosa*-Stämme zeigten immense Variabilität der Stämme bezüglich ihrer Virulenzfaktoren und ihrer morphologischen Merkmale. Es konnte kein Virulenzfaktor bestimmt werden, der bei allen Stämmen vorhanden war und somit den bedeutendsten Faktor in Infektionen mit *P. aeruginosa* ausmachte. Es handelt sich scheinbar bei *P. aeruginosa*

Infektionen um eine multifaktorielle Virulenz, die von den Stämmen ausgebildet wird. So sind sie optimal an verschiedene Habitate angepasst.

1.5 Antibiotika-Resistenz von *P. aeruginosa*

Infektionen mit *P. aeruginosa* sind oft sehr langwierig und aufgrund der intrinsischen Antibiotikatoleranz von *P. aeruginosa* schwer zu behandeln (Borriello *et al.*, 2004, Mah und O´Toole, 2001). *P. aeruginosa* nutzt hierbei sogenannte „multidrug“ Efflux-Pumpen, um Antibiotika aus dem Cytosol zu entfernen, sowie chromosomal codierte Resistenzgene, wie z. B. β -Lactamasen, für die Degradation der Antibiotika. Weiterhin ist er in der Lage, vermutlich durch Mutation in Bestandteilen der Zellmembran, die Aufnahme bestimmter Antibiotika zu verhindern. So wurden resistente Stämme ohne das Porin OprD beschrieben, welches an der Aufnahme von Imipenem beteiligt ist (Kwon und Lu, 2007). Durch undurchlässige Membranen gelangen Antibiotika vermindert in die Bakterienzelle. Damit wird deren Wirkung minimiert (Lambert, 2002, Driscoll *et al.*, 2007). Es werden vermehrt sogenannte multiresistente *P. aeruginosa*-Stämme aus Infektionen isoliert. Erschwerend kommt hinzu, dass durch Verabreichung von Antibiotika unterhalb der minimalen Inhibierungs-Konzentration (MIC) die Anpassung, und damit Resistenz, gegen das eingesetzte Antibiotikum stark zunimmt (Marr *et al.*, 2007). Das Vorkommen von Arginin bzw. Nitrat, welche *P. aeruginosa* unter anaeroben Bedingungen zur Energiegewinnung dienen, erhöhte in Studien die Resistenz gegenüber den eingesetzten Antibiotika zusätzlich um das 10- bis 100-fache (Borriello *et al.*, 2006).

1.6 Das Typ III Sekretionssystem

Wie bereits erwähnt nutzt *P. aeruginosa* zur Sekretion vieler Virulenzfaktoren neben Membranvesikeln 5 Sekretionssysteme. Das Typ III Sekretionssystem (TTSS) dient der Manipulation eukaryotischer Wirtszellen (Yahr *et al.*, 1996). Es formt komplexe, nadelähnliche Strukturen an der Bakterienoberfläche, mit deren Hilfe Effektorproteine in die Wirtszelle eingeschleust werden können (Hauser, 2009).

Das TTSS setzt sich aus 36 Genen zusammen, die in fünf Operons angeordnet sind. Sechs weitere Gene, die auf dem Chromosom verteilt sind, codieren für die Effektorproteine, sowie deren Chaperone (Shen *et al.*, 2008). Es besteht aus dem

Nadel-Komplex (*pscUTSRQPON*), der sich von der Cytoplasmamembran des Bakteriums durch die Peptidoglykanschicht in die äußere Membran erstreckt, und dem Translokations-Apparat (*popBD*, *pcrV*), welcher in der Plasmamembran der Wirtszelle errichtet wird und die Effektorproteine ins Cytosol des Wirtes entlässt. Der Nadel-Komplex selbst besteht aus zwei Untereinheiten, der Basis, gebildet aus mehreren Ringen, und dem Nadelfilament (Pastor *et al.*, 2005). Es dient zum Einen der Weiterleitung der Proteine und zum Anderen registriert es den Kontakt zur Wirtszelle. Die Länge des Nadelfilaments beträgt 60-120 nm und wird vermutlich durch das Protein PscP reguliert (Hauser, 2009). Der Durchmesser beträgt etwa 6-10 nm. Bei dem Translokations-Apparat handelt es sich um eine 2,8-6,0 nm breite Membranpore (*popBD*), welche die sekretierten Proteine aufnimmt und in die Plasmamembran weiterleitet. Dieser Prozess ist sehr Effizient, da nur etwa 0,1 % der sekretierten Proteine im extrazellulären Raum verloren geht (Sundin *et al.*, 2004). Durch das Einschleusen der Proteine werden in der Wirtszelle zum Schutz Abwehrmechanismen in Gang gesetzt, die den Zelltod nach sich ziehen (Roy *et al.*, 2004). Selbst ohne das Einschleusen von Effektorproteinen reicht die Bildung der Pore in der Plasmamembran der Wirtszelle aus, um ihren Zelltod auszulösen, da die Permeabilität der Zelle zunimmt (Dacheux *et al.*, 2001). Das TTSS kann sowohl transkriptionell reguliert werden, indem die einzelnen Bestandteile erst bei einem Wirtszellkontakt produziert werden, als auch über die Initiation der Sekretion (Hauser, 2009). Induziert wird das TTSS durch Calcium Mangel (Frank, 1997).

Bislang sind bei *P. aeruginosa* vier Effektorproteine beschrieben (Engel und Balachandran, 2009). Im Vergleich zu anderen Typ III Sekretionssystemen ist das die geringste Anzahl, da beispielsweise *Yersinia spp.* 6 und *Shigella spp.* bis zu 25 Effektorproteine ausweist (Hauser, 2009). Die bekannten Proteine in *P. aeruginosa* sind ExoS, ExoU, ExoT und ExoY. Diese vier Proteine sind in der Regel nicht alle gemeinsam in einer Bakterienzelle zu finden. So besitzen 92-100 % der Stämme ExoT, 89 % ExoY, 58-72 % ExoS und 28-42 % ExoU, wobei die letzten beiden nur in seltenen Ausnahmen gemeinsam vorkommen (Feltman *et al.*, 2001). Über die Funktion der Effektorproteine ist bereits einiges bekannt. So handelt es sich bei ExoS um ein 48 kDa großes, bifunktionales Toxin, welches sowohl ein GTPase aktivierendes Protein ist, als auch eine ADP Ribosyltransferase Aktivität besitzt. Es löst einen verzögerten Zelltod durch Apoptose beim Wirt aus (Fleiszig *et al.*, 1997). ExoT (49 kDa) besitzt 76 % identische Aminosäuren zu ExoS und hat die selben Funktionen. Die Phospholipase ExoU (74 kDa) löst einen schnellen Zelltod der Wirtszelle aus (Schulert *et al.*, 2003). Bei der Adenylylcyclase ExoY handelt es sich um ein 42 kDa großes Protein, welches

ATP als Substrat nutzt (Yahr *et al.*, 1998). Für ExoS, ExoT und ExoU sind Chaperone bekannt, die an die Proteine binden und sie so zum Sekretionssystem leiten (Shen *et al.*, 2008, Finck-Barbançon *et al.*, 1998).

1.7 Der Transkriptionsfaktor SlyA und die MarR Familie von Transkriptionsregulatoren

Die schnelle Anpassung an Umwelteinflüsse oder ein neues Habitat wird in Bakterien über Transkriptionsregulatoren gesteuert. *P. aeruginosa* besitzt 10 % Regulatoren im Genom, die eine enorme Anpassungsfähigkeit ermöglichen (Stover *et al.*, 2000). Sie können sowohl positiv als auch negativ regulierend wirken. Eine bedeutende Familie von Transkriptionsregulatoren ist die MarR Familie (Ellison und Miller, 2006). Die 336 Mitglieder dieser Familie sind verteilt auf 45 Bakterienspezies und 13 Archeaspezies und somit weit verbreitet (Ellison und Miller, 2006). Die Reaktion auf Stressfaktoren wie Säure oder auch oxidativen Stress wird von ihnen beeinflusst (Spory *et al.*, 2002). Daher ist auch das Überleben von Bakterien in Makrophagen möglich, obwohl reaktive Sauerstoffspezies vorkommen (Buchmeier *et al.*, 1997). Sie sind beteiligt an der Regulation von Antibiotika-Resistenz-Mechanismen (MexR, *P. aeruginosa*, Srikumar *et al.*, 1998), antimikrobieller Agenzien (Rap in *Serratia marcescens*, Thomson *et al.*, 1997) und Virulenz (SlyA in *Salmonella typhimurium*, Libby *et al.*, 1994).

Das *Salmonella* hemolysin A (SlyA, Salmolysin) wurde 1994 erstmals von Libby *et al.* untersucht (Libby *et al.* (1994)). Es wurde als hämolytisch und cytolytisch aktives Protein beschrieben, welches bei einem Screening auf Blutagar aufgefallen war, da *Salmonella* zuvor nicht als hämolytisch beschrieben war. Durch die Konstruktion einer Knock-out Mutante stellte sich heraus, dass SlyA die Virulenz in Mäusen, sowie das Überleben von *Salmonella* in Makrophagen vermittelt (Libby *et al.*, 1994, Daniels *et al.*, 1996). Durch Sequenzvergleiche konnte SlyA später der MarR Familie von Transkriptionsregulatoren zugeordnet werden (Nagel *et al.*, 2001, Linehan *et al.*, 2005). Mittlerweile sind einige homologe Proteine zu SlyA, die an der Virulenz beteiligt sind, in anderen pathogenen Spezies genauer untersucht worden. RovA (regulator of virulence, *Yersinia enterocolitica*, Revell und Miller, 2000), PecS (*Dickeya dadantii*, Reverchon *et al.*, 1994), MgrA (*Staphylococcus aureus*, Ingavale *et al.*, 2005) und AphA (*Vibrio cholerae*, Kovacikova *et al.*, 2004) sind weitere Vertreter der MarR Familie.

Mit Hilfe von Kristallstrukturanalysen mehrerer MarR-Proteine konnte gezeigt werden, dass es sich um Dimere mit einer konservierten Helix-turn-Helix Domäne handelt (Aleksun *et al.*, 2001; Lim *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2003). Die Aminosäuresequenzen der einzelnen Proteine der MarR Familie dagegen sind, wie auch die Regulationsmechanismen, heterogen. Für SlyA aus *E. coli* konnte eine Feedback-Inhibierung festgestellt werden, ausgelöst durch die Konkurrenz zwischen SlyA und der RNA-Polymerase um dieselbe Bindestelle (Stapleton *et al.*, 2002). Auch für RovA aus *Y. pseudotuberculosis* wurden von Heroven *et al.* (2004) vergleichbare Beobachtungen gemacht.

MarR-Transkriptionsregulatoren können sowohl als Aktivatoren, wie auch als Repressoren für die Expression von Genen und den zugehörigen Proteinen dienen (Spory *et al.*, 2002; Navarre *et al.*, 2005). Bezüglich der Aktivierung konnte gezeigt werden, dass Kultivierungsmedium, Wachstumsphase, Osmolarität, pH und Temperatur Einfluss auf die Expression von RovA besitzen (Nagel *et al.*, 2001). Eine temperaturabhängige Transkription konnte ebenfalls bei *slyA* aus *E. coli* nachgewiesen werden. So wird *slyA* bei 37 °C weitaus stärker exprimiert, als bei 25 °C (Corbett *et al.*, 2007). Aufgrund der hohen Sequenzhomologien zwischen *E. coli slyA* und *Yersinia rovA* zum *slyA* aus *P. aeruginosa*, liegt in *P. aeruginosa* möglicherweise ebenfalls eine temperaturabhängige Regulation vor.

1.8 Ziel der Arbeit

Das Hauptziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe eines zuvor etablierten *in vitro* Biofilm-Anzuchtssystems die physiologischen Eigenschaften von *P. aeruginosa* PAO1 unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen zu untersuchen. Hierzu sollte ein artifizielles Urin-medium (AUM) verwendet werden, um die Nährstoffversorgung im Harnweg zu simulieren. Als Referenz sollte 1:10 verdünntes LB Medium dienen, da es sich in Bezug auf das Wachstumsverhalten von *P. aeruginosa* PAO1 und final erreichte Zellzahlen als adäquate Referenz gezeigt hat. Da es sich bei Harnwegsinfektionen generell um Biofilm-assoziierte Infektionen handelt, sollten die Bakterien in Form von Koloniebiofilmen angezüchtet werden. Zusätzlich zu den Referenzstämmen *P. aeruginosa* PAO1 und PA14 sollten 31 klinische Harnwegs isolate in die Untersuchungen einbezogen werden, um so die spezifischen physiologischen Eigenschaften von *P. aeruginosa* in Harnwegsinfektionen betrachten zu können.

Da im Harnweg sowohl aerobe als auch anaerobe Nischen vorhanden sind, sollten *P. aeruginosa* PAO1 Transkriptomanalysen unter aeroben und anaeroben Bedingungen in AUM und 1:10 LB durchgeführt werden, um die Anpassung an den Harnweg auf transkriptioneller Ebene zu studieren.

Ein weiterer Schwerpunkt sollte auf die Untersuchung des Transkriptionsregulators SlyA, der MarR Familie zugehörig und ein Homolog zu RovA aus *Yersinia*, gelegt werden. Da die Zielgene dieses Regulators bei *P. aeruginosa* noch nicht untersucht sind, sollten per Transkriptomstudien die Zielgene identifiziert werden, um so möglicherweise Aufschluss über die Funktion von SlyA zu erhalten.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Materialien

Für diese Arbeit wurden einige spezielle Materialien und kommerzielle Kits regelmäßig verwendet. Diese sind hier aufgelistet:

- RNeasy Kit: Quiagen, Hilden
- RNase-Free DNase Set: Quiagen, Hilden
- QIAquick PCR Purification Kit: Quiagen, Hilden
- Lowry total Protein Kit: Sigma, Steinheim
- Quant-ItTM PicoGreen[®] dsDNA Assay Kit: Invitrogen, Karlsruhe
- Molekularbiologische Enzyme: New England Biolabs, Frankfurt
- Oligonukleotide: Metabion, Martinsried
- Sterilfilter: 0,22 μ m Porengröße, Sarstedt AG, Nümbrecht
- Membranfilter: Millipore Durapore Membrane Filters, Type 0,22 μ m, GV Millipore, Eschborn
- GeneChip[®] *Pseudomonas aeruginosa* Genome Array: Affymetrix, Santa Clara, USA

Die weiterhin verwendeten Chemikalien und Reagenzien, die hier nicht explizit Erwähnung finden, wurden von folgenden Firmen bezogen: Difco, Fluka, Merck, Riedel-de-Häen, Roth, Serva oder Sigma.

2.1.1 Nährmedien

Die in den Versuchen eingesetzten Medien und ihre Zusammensetzung sind in Tabelle 1 aufgeführt. Alle Medienkomponenten wurden, sofern nicht anders beschrieben, in deionisiertem Wasser gelöst und autoklaviert bzw. steril filtriert. Für feste Medien wurden standardmäßig 15 g/l Agar (Span-Agar, Hellmuth Caroux GmbH, Hamburg) zugesetzt und jeweils ca. 25 ml mit Agar versetztes Medium in eine Petrischale gegossen.

Tabelle 1: Verwendete Medien und ihre Zusammensetzung

Medium	Zusammensetzung
Vollmedien	
Luria Broth (LB)	10 g/l Trypton 5 g/l Hefe-Extrakt 10 g/l NaCl
1:10 LB	1 g/l Trypton 0,5 g/l Hefe-Extrakt 1 g/l NaCl
Definierte Medien	
Artificial urine medium (AUM), Lösung 1	1 g/l Pepton 5 mg/l Hefe-Extrakt 1,1 mM Milchsäure (0,1 g/l) 2 mM Zitronensäure (0,4 g/l) 170 mM Harnstoff (10 g/l) 400 μ M Harnsäure (0,07 g/l) 7 mM Kreatinin (0,8 g/l) 90 mM Natriumchlorid (5,2 g/l) 5 μ M Eisen(II)sulfat x 7 H ₂ O (0,0012 g/l) 2 mM Magnesiumsulfat x 7 H ₂ O (0,49 g/l) 10 mM Natriumsulfat (1,4 g/l) 25 mM Ammoniumchlorid (1,3 g/l)
Lösung 2	25 mM Natriumhydrogencarbonat (2,1 g/l) 2,5 mM Calciumchlorid x 2 H ₂ O (0,37 g/l)
Lösung 3	7 mM Kaliumdihydrogenphosphat (0,95 g/l) 7 mM di-Kaliumhydrogenphosphat (1,2 g/l) ad 1 l A.dest., pH 6,5

Um die Bedingungen im Harnweg zu simulieren, wurde ein *Artificial Urine Medium* (AUM) hergestellt (siehe Tabelle 1), welches in der Zusammensetzung dem menschlichen Urin entspricht (Brooks und Keevil, 1997).

Für Lösung 1 wurden alle in der Tabelle unter Lösung 1 aufgeführten Bestandteile in dH₂O so gelöst, dass eine doppeltkonzentrierte Lösung entstand. Ihr pH-Wert wurde auf 6,5 eingestellt. Für Lösung 2 wurden zunächst Natriumcarbonat und Calciumchlorid in dH₂O auf einen pH-Wert von 2 mit konz. Salzsäure gesenkt, um die Salze zu lösen. Hierbei entstand Calciumcarbonat. Der pH-Wert wurde anschließend mit Natriumhydroxid (2 M oder 6 M) wieder auf 6,5 gebracht. Lösung 3 beinhaltet die Pufferkomponenten (KH₂PO₄ und K₂HPO₄), welche in dH₂O gelöst wurden, bevor der pH-Wert ebenfalls auf 6,5 eingestellt wurde. Vor dem Sterilfiltrieren (Porendurchmesser 0,2 μ m) wurden Lösung 3 und Lösung 1 vermischt, anschließend wurde Lösung 2 hinzugefügt.

Tabelle 2: Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA pH 8.5
TBE-Puffer	89 mM Tris-Acetat 89 mM Borsäure 2 mM EDTA
Kaliumphosphat-Puffer, 1 M	800 ml 1 M K_2HPO_4 vorlegen und mit 1 M KH_2PO_4 auf pH 7.4 titrieren (ca. 200 ml)
Tris-HCl, pH 8.0	1 M Tris mit HCl auf pH 8.0 einstellen
0,1 x TE-Puffer	1 mM Tris-HCl, pH 7.5 100 μM EDTA

Als Referenzmedium zum AUM wurde 1:10 verdünntes LB-Medium verwendet (siehe Kapitel 2.1.1). Die Zusammensetzung ist in Tabelle 1 aufgeführt. Versuche in der Zellkultur wurden mit Zellkulturmedium RPMI 1640 (mit 5 % Newborn Calves Serum, 1 % C-Glutamat) der Biochrome AG durchgeführt.

2.1.2 Puffer und Lösungen

Verwendete Puffer und Lösungen sind in Tabelle 2 dargestellt. Aufgeführt sind deren Komponenten und ihre Konzentration im fertigen Puffer bzw. die Einwaagemenge pro Liter. Der pH-Wert der Lösungen und Puffer wurde, soweit er einzustellen war, ebenfalls aufgeführt. Spezielle Puffer, die nur für bestimmte Versuche verwendet wurden, sind in den Kapiteln aufgeführt, in denen sie Verwendung fanden.

2.1.3 Bakterienstämme und Makrophagen

Die für die Versuche verwendeten *P. aeruginosa*-Stämme sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die verwendeten *E. coli*-Stämme sowie die verwendeten Makrophagen wurden in Tabelle 4 zusammengefasst. Es wurden die *P. aeruginosa* Laborstämme PAO1 und PA14 für die Wachstumskurven-Versuche verwendet. Die 31 klinischen Isolate wurden über ApiZONE-Teststreifen (Biomérieux, Nürtingen) und PCR-basiertem Assay (Spilker

et al., 2004) als *P. aeruginosa*-Stämme identifiziert und in meiner Diplomarbeit, sowie in dieser Arbeit, weitergehend untersucht.

Tabelle 3: Beschreibung verwendeter *P. aeruginosa* Stämme. Die Isolate von Dr. M. Hogardt stammen aus der Klinik München, die von Dr. R. Neubauer stammen aus Privatpraxis (P) oder aus der Klinik in Braunschweig (K). Isolate aus chronischen Infektionen: (chronisch), MSU= Mittelstrahlurin

Stamm	Beschreibung	Referenz/Quelle
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>-Stämme		
PAO1	Laborstamm	Holloway <i>et al.</i> , 1979
PA14	Laborstamm	Holloway <i>et al.</i> , 1979
PAO1 \ddot{U} <i>slyA</i>	pBBR1-MCS1:: <i>slyA</i> , Überexpression von <i>slyA</i> im PAO1 Wildtyp	S. Thomas
PAO1 Δ <i>rhlR</i>	PAO1 Deletionsmutante von <i>rhlR</i>	Beatson <i>et al.</i> , 2002, Schreiber <i>et al.</i> , 2006
PAO1 Δ <i>lasR/rhlR</i>	PAO1 Deletionsmutante von <i>lasR</i> und <i>rhlR</i>	Beatson <i>et al.</i> , 2002, Schreiber <i>et al.</i> , 2006
Klinische Isolate aus Harnwegsinfektionen		
MH05	Isolat aus Katheter-Urin	Dr. M. Hogardt
MH06	Isolat aus MSU	Dr. M. Hogardt
MH07	Isolat aus Katheter-Urin	Dr. M. Hogardt
MH08	Isolat aus MSU	Dr. M. Hogardt
MH09	Isolat aus MSU	Dr. M. Hogardt
RN12	Isolat aus MSU (K)	Dr. R. Neubauer
RN13	Isolat aus MSU (P)	Dr. R. Neubauer
RN14	Isolat aus MSU (P)	Dr. R. Neubauer
MH15	Isolat aus Katheter-Urin	Dr. M. Hogardt
MH16	Isolat aus MSU	Dr. M. Hogardt
MH17	Isolat aus MSU	Dr. M. Hogardt
MH18	Isolat aus Katheter-Urin	Dr. M. Hogardt
MH19	Isolat aus Katheter-Urin	Dr. M. Hogardt
MH20	Isolat aus Katheter-Urin (chronisch)	Dr. M. Hogardt
RN21	Isolat aus MSU (P)	Dr. R. Neubauer
MH25	Isolat aus Katheter-Urin (chronisch), Folgeisolat von MH18	Dr. M. Hogardt
MH26	Isolat aus MSU	Dr. M. Hogardt
MH27	Isolat aus Katheter-Urin (chronisch)	Dr. M. Hogardt
MH28	Isolat aus MSU	Dr. M. Hogardt
MH29	Isolat aus MSU	Dr. M. Hogardt
MH30	Isolat aus Katheter-Urin (chronisch), Folgeisolat von MH27	Dr. M. Hogardt
MH33	Isolat aus Katheter-Urin	Dr. M. Hogardt

Tabelle 3: Fortsetzung: Beschreibung verwendeter *P. aeruginosa* Stämme

MH34	Isolat aus Katheter-Urin	Dr. M. Hogardt
MH35	Isolat aus Katheter-Urin	Dr. M. Hogardt
MH36	Isolat aus Katheter-Urin	Dr. M. Hogardt
MH37	Isolat aus Katheter-Urin	Dr. M. Hogardt
MH38	Isolat aus Katheter-Urin	Dr. M. Hogardt
MH39	Isolat aus Katheter-Urin	Dr. M. Hogardt
MH55	Isolat aus Katheter-Urin	Dr. M. Hogardt
MH56	Isolat aus Katheter-Urin	Dr. M. Hogardt
MH57	Isolat aus Katheter-Urin	Dr. M. Hogardt

Tabelle 4: Weitere Stämme und Makrophagen. Aufgelistet sind die verwendeten *E.coli* Stämme und *A. tumefaciens* Reporterstämme, sowie deren genetische Ausstattung und die Quelle.

Stamm	Beschreibung	Referenz/Quelle
<i>Escherichia coli</i>-Stämme		
DH5 α	$\phi 80\Delta lacZ\Delta M15$ <i>rec A1 end A1 gryA96</i> <i>thi-1 hsdR17(r_K-m_K+) supE44 relA1</i> <i>deoR</i> $\Delta(lacZYA-argF)$ U196	Hanahan, 1983
ST18	S17-1 λ -pir Δ hemA	Thoma, 2009
JM109 (pSB406)	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44</i> <i>relA1</i> $\Delta(lac-proAB)$ <i>mcrA</i> [F' <i>traD36</i> <i>proAB lacI^q lacZ</i> Δ M15, pSB406, rhlRI':luxCDABE, Reporterstamm für C ₄ -HSL	Winson <i>et al.</i> , 1998
JM109 (pSB1075)	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44</i> <i>relA1</i> $\Delta(lac-proAB)$ <i>mcrA</i> [F' <i>traD36</i> <i>proAB lacI^q lacZ</i> Δ M15, pSB1075, las- RI':luxCDABE, Reporterstamm für 3- oxo-C ₁₂ -HSL	Winson <i>et al.</i> , 1998
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		
NTL4	TraI-LacZ Fusion, Gm ^r (PZLR4), Reporterstamm für N-Acyl-L- Homoserinlactone (3-oxo-C ₁₂ -HSL)	Fuqua und Winans, 1996
Makrophagen		
J774	murine Makrophagen (ATCC TIB-67)	More <i>et al.</i> , 1967

2.1.4 Oligonukleotide und Plasmide

Die für diese Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Angegeben sind jeweils die Primerpaare, deren Sequenz, sowie deren Schmelztemperatur (T_m). Das Primerpaar oPT01/02 diente der Amplifikation des *slyA* Gens (PA3341) aus *P. aeruginosa* PAO1 nebst Promotorsequenz.

Tabelle 5: Verwendete Oligonukleotide

Primer	Gen	Sequenz	T_m [°C]
oPT01	PA3341	5'-GGGGTACCGGAAGTGGGCTTGCCCTGT-3'	74
oPT02	PA3341	5'-CGAGCTCTTCGTGACGCAGTGCTCAG-3'	73
gyrB-fw1	PA0004	5'-TTCGAGGTGGTGGATAAC-3'	54
gyrB-bw1	PA0004	5'-GATATCCACCGGAATACC-3'	54
rpoD-fw1	PA0576	5'-AAGCGCAACAGCAATCTC-3'	54
rpoD-bw1	PA0576	5'-GATGTCTTCCACCTGTTC-3'	54
exoS-fw1	PA3841	5'-AATCGCTTCAGCAGAGTC-3'	54
exoS-bw1	PA3841	5'-CAACTGCTGCGCTTCACT-3'	54
exoU-fw1	PA14_51530	5'-CTGAATCAGGAGCCTGTC-3'	57
exoU-bw1	PA14_51530	5'-TTCCCGGAAAGTATTCCC-3'	54

In dieser Arbeit wurde das Plasmid pBBR1-MCS1 (Kovach *et al.*, 1994; Cm^r , $lacZ\alpha$, P_{lac} , P_{t7} , mob, low copy Expressionsvektor, Leervektor) verwendet. Der Leervektor wurde in den Wildtypstamm *P. aeruginosa* PAO1 transformiert. Dieser Stamm wurde als Referenz zum Überexpressionsstamm PAO1Ü_*slyA*, welcher das Plasmid pBBR1-MCS1::*slyA* (Überexpression von *slyA* im *P. aeruginosa* PAO1 Wildtyp, S. Thomas) trägt, verwendet. Durch vergleichende Analysen konnte bei den folgenden Experimenten ausgeschlossen werden, dass der beobachtete Effekt einzig durch den Leervektor ausgelöst wurde.

2.1.5 Geräte

Geräte, die während der Forschungsarbeit Einsatz fanden, sind in Tabelle 6 samt Hersteller und Firmensitz aufgelistet.

Tabelle 6: Verwendete Geräte, deren Modellbezeichnung nebst Hersteller und Firmensitz

Gerät	Modell	Hersteller, Firmensitz
Agarosegel-Elektrophoresekammer	Agagel Mini	Biometra, Göttingen
Anaerobenzelt	Forced Air Incubator	Coy Laboratory Products Inc, Grass Lake, USA
Anaerobenzelt-Schleuse	Manual Airlock	Coy Laboratory Products Inc, Grass Lake, USA
Autoklav	EL 3850	Systec, Wettenberg
Bioanalyzer	Bioanalyzer 2100	Agilent, Waldbronn
Brutschrank	Fine line	Heraeus, Hanau
Fluorimeter	Fluoreszenz Spektrometer	
Lumineszenz Spektrometer	LS50B	PerkinElmer, Offenbach
Mikrotiterplatten-Lesegerät	Fusion	Packard Biosciences, Meriden
PCR Gradientencycler	C1000 Thermal cycler	Biorad, München
pH-Messgerät	pH211 Microprocessor	Hanna Instruments, Kehl
Pipetten	Research	Eppendorf, Hamburg
Quantitative PCR Cyclyer	CFX96	Biorad, München
Reinstwasseranlage	Milli-Q System	Millipore, Eschborn
Schüttelbad	Type AT15	Infors AG, Bottmingen, CH
Sicherheitswerkbank	HeraSafe	Heraeus, Hanau
Sicherheitswerkbank-Zellkultur	LaminAir HLB 2472	Heraeus, Hanau
Thermomixer	Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Vakuum Zentrifuge	SpeedVac SPD 101 B	Savant
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Zentrifugen	Mini Spin	Eppendorf, Hamburg
	Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau
	Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Waagen	Feinwaage Sartorius Typ: 2472	Sartorius, Göttingen
	Sartorius universal	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	C12 Thermoboy	mgw LAUDA, Königshofen

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Stammhaltung und Lagerung von Bakterien und Makrophagen

Zur längerfristigen Aufbewahrung von Bakterienstämmen wurden Glycerin-Gefrierkulturen angelegt. 850 μl einer stationären Kultur (in LB-Medium, 200 rpm, ü.N.) wurden mit 150 μl sterilem, 100 %igem (v/v) Glycerin gemischt. Die Bakterienkulturen wurden kurz intensiv geschüttelt und anschließend für 20 min im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Für die Stammhaltung der J774 Makrophagen wurden die Zellen in einer mittleren Zellkulturflasche (Sarstedt, Nümbrecht) 2 d inkubiert. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen mit einem Zellschaber (Sarstedt, Nümbrecht) abgeschabt und in 10 ml Gefriermedium (80 % FBS mit 20 % DMSO) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in 1,5 ml Aliquots in Kryoröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) abgefüllt und mittels Kryocontainer (5100 Cryo 1 °C, Mr. Frosty, Nalgene, New York, USA) im -80 °C Gefrierschrank eingefroren. Die bei -80 °C gelagerten Zellen konnten sechs Monate lang verwendet werden. Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden die Kryoröhrchen bei -196 °C in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.2 Wachstumsversuche mit planktonischen Kulturen

Für Untersuchungen unter Harnwegsinfektions-ähnlichen Bedingungen sollten die vorherrschenden Gegebenheiten im Harnweg so gut wie möglich nachgestellt werden. Als Referenzmedium diente 10-fach verdünntes LB-Medium (1:10 LB). Es wurden Wachstumskurven der zu untersuchenden Stämme angefertigt. Hierzu wurden planktonische Kulturen verwendet. Die Wachsrate (μ) einer Kultur wurde mit Hilfe einer Geraden bestimmt, die an die Steigung in der logarithmischen Phase des Bakterienwachstums angelegt wurde. Zur Herstellung einer planktonischen Kultur wurden 5 ml LB-Vorkultur der zu untersuchenden Stämme angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm aerob schüttelnd inkubiert. Die Hauptkultur wurde am nächsten Tag auf eine $\text{OD}_{578\text{ nm}}$ von 0,05 mit der Vorkultur im entsprechenden Medium beimpft und bis zu 6 Tage im 37 °C Wasserbad bei 200 rpm aerob in Schüttelkolben mit Schikane schüttelnd inkubiert. In den ersten acht bis zehn Stunden wurde stündlich 1 ml Probe entnommen

und sofort photometrisch bei 578 nm vermessen. Nach 24 h, 48 h und 72 h wurden ebenfalls Proben entnommen und die $OD_{578\text{ nm}}$ bestimmt.

Bei anaeroben planktonischen Wachstumsuntersuchungen wurde ebenfalls eine aerobe LB-Vorkultur hergestellt (s. o.), mit der 150 ml Anaerob-Flaschen am nächsten Tag beimpft wurden. Es wurden 140 ml Medium in die Flaschen gegeben, welche mittels eines Gummistopfens luftdicht verschlossen wurden. Die Flaschen wurden im 37 °C Wasserbad bei 100 rpm schüttelnd inkubiert. Der Sauerstoff, der sich noch im Medium befand, wurde innerhalb kurzer Zeit verbraucht, sodass sich anaerobe Verhältnisse einstellten. Für die Entnahme der Proben aus den Anaerob-Flaschen wurden 2 ml-Kanülen verwendet, um das Eindringen von Sauerstoff in die Flaschen möglichst gering zu halten. Die optische Dichte der Proben wurde wie oben beschrieben bestimmt.

2.2.3 Wachstum von Biofilmen auf Membranfiltern

2.2.3.1 Vorbereitungen und Filter-Beimpfung

Als Vorbereitung für das Ansetzen von Filterbiofilmen wurde eine Vorkultur hergestellt, indem 5 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie des Stamms bzw. 50 μl einer Flüssigkultur beimpft und ü.N. bei 37 °C und 200 rpm aerob schüttelnd inkubiert wurde. Diese Vorkultur wurde 1:2500 (ausgehend von einer $OD_{578\text{ nm}}$ von 5,0) verdünnt. Von der Verdünnung wurden dann 50 μl auf einen kleinen (\varnothing 2,5 cm) Polycarbonat Membranfilter (Millipore, Porengröße: 0,22 μm) flächig verteilt. Die Filter waren zuvor auf sterilem Whatman-Papier platziert worden, sodass der Flüssigkeitsfilm vollständig aufgesogen werden konnte. Auf diese Weise sollte eine gleichmäßige Verteilung der Bakterien auf dem Membranfilter und damit eine gleichmäßige Ausbildung des Biofilms erzielt werden. Anschließend wurden die Filter auf LB-Agarplatten überführt und den Versuchsbedingungen entsprechend aerob oder anaerob bei 37 °C inkubiert.

Bei allen durchgeführten Experimenten dieser Arbeit betrug die Inkubationsdauer der Biofilme bis zu sechs Tage. Die Filter wurden während dieser Inkubationszeit täglich auf frische Agarplatten umgesetzt, um ausreichende Nährstoffversorgung gewährleisten zu können. Für die Inkubation unter Sauerstoffausschluss wurden die Agarplatten mindestens einen Tag vor Gebrauch in das Anaerobenzelt eingeschleust, um möglichst viel Sauerstoff aus den Platten diffundieren zu lassen. Auf einer Agarplatte wurden je nach Versuch bis zu fünf Filter gleichzeitig platziert.

2.2.3.2 Zellernte

Um die Zellen der Biofilme von den Filtern ablösen und für weiterführende Experimente einsetzen zu können, wurden die Filter für die Bestimmung der Kolonie bildenden Einheiten (KBE) und die OD-Bestimmung in 1 ml 100 mM Kalium-Phosphat-Puffer, pH 7,4, aufgenommen. Das Ablösen der Zellen erfolgte dann durch intensives Schütteln auf dem Vortexer und zusätzliches Abschaben des Biofilms mit Hilfe einer Pipettenspitze.

2.2.3.3 KBE-Bestimmung

Für die KBE-Bestimmung wurden die Bakteriensuspensionen mittels Verdünnungsreihen dezimal bis zu $1 \cdot 10^{-12}$ verdünnt. Von den so angefertigten Verdünnungen wurden, von maximal 8 Verdünnungsstufen, jeweils 30 μ l mittels Mehrkanalpipette auf eine gut getrocknete LB-Platte aufgetropft, über Nacht aerob bei 37 °C bebrütet und am nächsten Tag ausgewertet, indem die entstandenen *P. aeruginosa*-Kolonien ausgezählt wurden. Anschließend wurde unter Berücksichtigung der ausgezählten Verdünnungsstufe die Anzahl der KBE/ml berechnet.

2.2.4 Bestimmung von Beweglichkeiten von *P. aeruginosa*

P. aeruginosa ist mit Hilfe von Flagellen und Pili in der Lage, sich fortzubewegen. Man unterscheidet zwischen drei Arten der Bewegung: Schwimmen, Schwärmen und die Bewegung entlang einer Oberfläche (Twitching Motility). Um zu schwimmen benötigen die Bakterien Flagellen (O'Toole und Kolter, 1998). Die Twitching Motility wird durch Typ IV Pili vermittelt (Mattick, 2002) und beim Schwärmen werden beide Organellen benötigt (Köhler *et al.*, 2000).

Die Lösungen, die für die Beweglichkeitstests benötigt wurden, sind in Tabelle 7 aufgelistet. Die Medien basieren auf dem M9 Medium nach Sambrook *et al.*, 1989.

Tabelle 8 zeigt die Zusammensetzung der einzelnen Testmedien. Die Angaben reichen jeweils für 450 ml Medium. Alle Lösungen wurden getrennt voneinander autoklaviert und nach dem Abkühlen auf 60 °C im Wasserbad zusammen gegeben. Jeweils 20 ml Agar-Medium wurde in Petrischalen gegossen und noch am selben Tag verwendet. Der Schwimmagar enthält 0,3 % Agar, der Schwärmagar ist 0,5 %ig.

Tabelle 7: M9 Medium (Sambrook *et al.*, 1989)

Lösung	Komponente	Konzentration
Lösung 1	D-Glucose	40 g/l
Lösung 2	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	20 g/l
Lösung 3	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	2 g/l
Lösung 4	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	70 g/l
	KH ₂ PO ₄	30 g/l
	NaCl	5 g/l
optional	NH ₄ Cl	10 g/l
Lösung 5	Bacto-Agar	2 % (w/v)
Lösung 6	Natriumglutamat	5 % (w/v)

Tabelle 8: Zusammensetzung der Beweglichkeits-Testmedien

Lösung	Schwärmagar	Schwimmagar
1	45 ml	45 ml
2	4,5 ml	4,5 ml
3	4,5 ml	4,5 ml
4	45 ml ohne NH ₄ Cl	45 ml mit NH ₄ Cl
5	112,5 ml	67,5 ml
6	4,5 ml	-
dH ₂ O	234 ml	283,5 ml

Die zu testenden *P. aeruginosa* Stämme wurden am Vortag des Tests frisch aus -80 °C Glycerin-Gefrierkulturen als Einzelkolonie-Ausstrich auf LB-Agarplatten ausgestrichen und ü. N. bei 37 °C bebrütet. Für den Test auf Twitching Motility wurden LB-Agarplatten zu ca. 10 ml gegossen. Mit einem sterilen Zahnstocher wurde etwas Material einer Einzelkolonie der LB-Agarplatten vom Vortag aufgenommen und dieser wurde dann in die Twitching Motility Platte bis auf den Petrischalenboden gestochen und für 24 h bei 37 °C bebrütet. Nach weiteren 48 h bei RT konnte bei Twitching Motility positiven Keimen eine trübe Zone um die eingestochene Kolonie beobachtet werden.

Die Schwimmagarplatten wurden ebenfalls punktförmig in der Mitte mit einer frischen Einzelkolonie beimpft. Nach 24 h bei 37 °C bildete sich bei den Keimen, die funktionelle Flagellen besitzen, eine trübe Zone um die Einstichstelle herum. Sie waren Schwimmbewegungs-positiv.

In den Schwärmagarplatten wurde als einzige Stickstoff-Quelle die Aminosäure Glutamat zur Verfügung gestellt. Auch hier wurde eine Einzelkolonie in die Mitte der Testplatte gegeben und für 48 h bei 37 °C inkubiert. Bei Schwärmbewegungs-positiven Kolonien konnten dendritische Muster von der Inokulationsstelle auf der Platte nach außen beobachtet werden.

Tabelle 9: Virulenzfaktoren-Testmedien und ihre Zusammensetzung

Virulenzfaktoren-Testmedien	Zusammensetzung
Blutagar/ Hämolysin-Testagar	40 g/l Caso-Agar 5 % (v/v) steril filtriertes Schafsblut (50 ml)
Magermilchagar/ Protease-Testagar	40 g/l Caso-Agar 10 % (w/v) Magermilchpulver (Difco, Sparks, United States)

2.2.5 Nachweis von Virulenzfaktoren in *P. aeruginosa*

Um die Harnwegs isolate, sowie die *P. aeruginosa*-Stämme PAO1 und PA14 auf ihre Virulenzfaktoren hin zu untersuchen, wurden verschiedene Agar-Testmedien wie in Tabelle 9 aufgelistet, hergestellt. Für den Hämolysin-Testagar wurde Caso-Agar (Roth, Karlsruhe) in deionisiertem Wasser gelöst, auf 950 ml aufgefüllt und autoklaviert. Anschließend wurde der Agar im Wasserbad auf ca. 50 °C abgekühlt und das ebenfalls auf 50 °C temperierte Schafsblut (defibriniert, steril; Acila, Weiterstadt) zugegeben. Für den Protease-Testagar wurden der Caso-Agar (Roth, Karlsruhe) und das gelöste Magermilchpulver (Roth, Karlsruhe) separat autoklaviert, auf 60 °C abgekühlt und zusammen gegeben. Die fertig gestellten Medien wurden anschließend unter der Sterilbank zu je 25 ml in Petrischalen gegossen. Nach Erstarren der Platten wurden diese unter der Sterilbank getrocknet.

Um die Aktivität der extrazellulären Enzyme der klinischen *P. aeruginosa*-Isolate zu testen, wurden pro Platte vier Löcher mit je 8 mm Durchmesser ausgestanzt. In diese Löcher wurden 50 µl sterilfiltrierter, zellfreier Überstand einer 24 h LB Kultur (37 °C, 200 rpm) pipettiert. Die Platten wurden 24 h bzw. 48 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und anschließend erfolgte die Auswertung über das Ausmessen des gebildeten Hofes um das ausgestanzte Loch herum. Zusätzlich wurden die verschiedenen *P. aeruginosa*- Stämme auf dem Testagar ausgestrichen und nach 24 h Bebrütung bei 37 °C ausgewertet. Es wurden mindestens Doppelbestimmungen durchgeführt. Eine positive Reaktion konnte anhand der folgend beschriebenen Veränderungen erkannt werden.

- Hämolysin-Testagar: von rot zu klar
- Protease-Testagar: von milchig zu klar

2.2.6 Quorum sensing Nachweise

2.2.6.1 Quorum Sensing Nachweis über *Agrobacterium tumefaciens* NTL4

Auch die Fähigkeit zur Kommunikation der Zellen untereinander via Quorum sensing sollte getestet werden. Dies wurde mit zwei verschiedenen Reporterstamm-Systemen durchgeführt. Der *A. tumefaciens* Reporterstamm NTL4 (traI-lacZ, Gm^r, pZLR4, Fuqua und Winans, 1996) dient dem Nachweis von Acyl-Homoserin-Lactonen mit langer Seitenkette (3-oxo-C₁₂-HSL). Sie sind spezifisch für das LasRI System in *P. aeruginosa*. Die Acyl-Homoserin-Lactone mit kurzer Seitenkette (C₄-HSL), welche von dem RhlRI System gebildet werden, können von dem *A. tumefaciens* Reporterstamm nicht erfasst werden. Der Reporterstamm wurde in *A. tumefaciens*-Minimal-Salz Medium (ATG) angezüchtet. Zur Vorkultur wurden 30 µg/ml Gentamycin gegeben. Die Einzelkomponenten des ATG Mediums, sowie der ATG-Indikatorplatten sind in Tabelle 10 aufgeführt. Die Indikatorlösung besteht aus dem Substrat 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal), 2 %ig in Dimethylsulfoxid (DMSO).

Tabelle 10: *A. tumefaciens* Medien-Komponenten

Lösung	Komponente	Konzentration
Lösung 1	NH ₄ Cl	20 g/l
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	6 g/l
	KCl	3 g/l
	CaCl ₂	200 mg/l
	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	50 mg/l
Lösung 2	K ₂ HPO ₄	60 g/l
	NaH ₂ PO ₄	23 g/l
Lösung 3	D-Glucose	10 % (w/v)
Lösung 4	Bacto-Agar	2 % (w/v)
alle Lösungen getrennt voneinander autoklavieren.		
Lösung 5	X-Gal in DMSO	2 % (w/v)

Zur Herstellung von 100 ml ATG Medium wurden je 5 ml der Lösungen 1 und 2 mit 2 ml Lösung 3 vermischt und mit 88 ml Wasser aufgefüllt. Die Inkubation des *A. tumefaciens* Stamms in ATG erfolgte bei 30 °C ü.N.. Für den Nachweis von Homoserinlactonen wurden Indikator-Agarplatten benötigt. Diese bestehen aus zwei Agarschichten, dem ATG-Agar und dem Indikator-Softagar. Für 100 ml ATG-Agar wurden, 5 ml der Lösungen 1 und 2 mit 2 ml Lösung 3 vermischt. Nach Zugabe von 13 ml Wasser wurde die Lösung zu 75 ml Lösung 4 gegeben und zu je 10 ml in Petrischalen gegossen. Nach dem Erstarren konnte der Indikator-Softagar hergestellt werden. Pro Platte wurden 5 ml benötigt. Für 50 ml wurden 15 ml ATG-Medium, 17,5 ml Lösung 4, sowie 100 µl Lösung 5 vermischt und zu 17,5 ml einer *A. tumefaciens*

ü.N. Kultur (zuvor abkühlen auf 45 °C) gegeben. Der Indikator-Softagar wurde zügig zu je 5 ml auf die ATG-Agarschicht gegossen und gleichmäßig verteilt. Die Platten sollten Lichtgeschützt gelagert und noch am selben Tag verbraucht werden.

Nach dem Erstarren der Platten werden aus jeder Platte 4 Löcher mit je 8 mm Durchmesser ausgestanzt. In diese konnten dann 50 µl zellfreier Überstand einer *P.aeruginosa* Testkultur gegeben werden. Die Platten wurden 24 h bei 30 °C im Dunkeln inkubiert. Zur Auswertung wurde die Breite des gebildeten blauen Hofes um das ausgestanzte Loch vermessen.

2.2.6.2 Quorum Sensing Nachweis über *Escherichia coli* Reporterstämme

In einem weiteren QS-Nachweis wurden die *E. coli* Reporterstämme JM109 pSB1075 und JM109 pSB406 verwendet (Tabelle 4). JM109 pSB406 reagiert spezifisch auf 3-oxo-C₁₂-HSL, welches vom LasRI System gebildet wird. *E. coli* JM109 (pSB1075) ist der spezifische Reporterstamm für das C₄-HSL vom RhlRI System. Die daraufhin über das Lux Operon gebildete Biolumineszenz kann im Varioskan Flash (Thermo Scientific, Waltham, USA) vermessen werden. Der Test wurde in 96 Well Mikrotiterplatten (Brand, Wertheim) durchgeführt.

Zu Beginn des Test wurden die beiden Reporterstämme *E. coli* JM109 pSB1075 und JM109 pSB406 aus der -80 °C Glycerin-Gefrierkultur frisch auf eine LB-Agarplatte mit 100 µg/ml Ampicillin ausgestrichen und 24 h bei 30 °C inkubiert. Von diesen Platten wurden am nächsten Tag einige Einzelkolonien in 10 ml steriler 0,14 M NaCl suspendiert und die OD_{578 nm} vermessen. Mit den Suspensionen wurden je 20 ml LB-Medium (gepuffert mit 50 mM AUM Puffer, siehe Tabelle 1) mit 100 µg/ml Ampicillin auf eine Bakterienkonzentration von ca. 1 x 10⁶ (OD_{578 nm} von 0,001 entspricht einer Zellzahl von ca. 8 x 10⁶) angeimpft. Die Kulturen wurden 24 h bei 180 rpm und 30 °C inkubiert.

Die Teststämme wurden derweil in gepuffertem LB-Medium (18 h, 37 °C, 200 rpm) bis zur Stationärphase angezogen und anschließend sterilfiltriert. 450 µl zellfreier Überstand wurden mit 50 µl 1M HCl angesäuert (18 h, RT), um die gebildeten N-Acyl-Homoserinlactone zu stabilisieren. Anschließend wurde der Überstand mit 500 µl gepuffertem Medium verdünnt (Probelösung).

Für die Durchführung des Tests wurden 200 µl Bakteriensuspension der Reporterstämme *E. coli* JM109 pSB1075 und JM109 pSB406 zu 2 µl der Probelösung in 96 Well Platten (Brand, Wertheim) vermischt. Die Lumineszenz der Platten wurde am

Tabelle 11: Lösungen und Puffer für den Cytotoxizitätstest

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
PBS-Puffer (phosphate buffered saline)	137 mM NaCl 2.7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
Zellkulturmedium	RPMI-Medium (Invitrogen, Karlsruhe) 1 % (w/v) Glutamin (Invitrogen, Karlsruhe) 1 % (w/v) Penicillin-Streptomycin (Invitrogen, Karlsruhe)
Infektionsmedium	RPMI (Invitrogen, Karlsruhe) 1 % (w/v) Glutamin (Invitrogen, Karlsruhe)
Tobramycin-Lösung	Zellkulturmedium (Invitrogen, Karlsruhe) Tobramycin Stammlösung: 50 mg/ml (Sigma, Deisenhofen) 1:100 verdünnt
MTT-Lösung	9 ml Zellkulturmedium 1 ml MTT-Stammlösung: 10 mg/ml (Sigma, Deisenhofen)

Varioskan Flash (Thermo Scientific, Waltham, USA) sofort vermessen (Nullwert), anschließend wurden die Ansätze bei 30 °C für 2 h inkubiert und erneut vermessen.

2.2.7 Cytotoxizitätstest

Der Cytotoxizitätstest ermöglicht die Untersuchung von *P. aeruginosa* Stämmen auf die Aktivität der Exoenzyme ExoU und ExoS (Hogardt *et al.*, 2007). Die für diesen Test benötigten Lösungen und Puffer sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Für die Durchführung des Cytotoxizitätstests wurden am Vortag je 100 µl Zellkulturmedium als Verdunstungsschutz in die äußersten Wells einer 96-Well Mikrotiterplatte (Brand, Wertheim) gegeben. Die restlichen Wells wurden mit je 100 µl einer J774-Zellsuspension befüllt, die auf $3,6 \cdot 10^5$ Zellen/ml eingestellt war. Die hierfür verwendeten Zellen wurden zuvor exakt zwei Tage in Zellkulturflaschen bei 37 °C, 5 % CO₂ in Zellkulturmedium angezogen, sodass die Zellen zu 80 % konfluent waren. Die 96 Well Mikrotiterplatten wurden über Nacht im CO₂-Inkubator bei 37 °C inkubiert. Es wurden jeweils 10 Wells pro *P. aeruginosa* Stamm verwendet. Zusätzlich wurden auf jeder Platte zwei Reihen J774 Zellen als Kontrollspalten behandelt. Diese wurden an Stelle der Bakteriensuspension mit reinem Infektionsmedium bedeckt. Des Weiteren

wurde von den zu untersuchenden *P. aeruginosa* Stämmen eine 5 ml ü. N.-Kultur in LB-Medium angelegt.

Am darauf folgenden Tag konnten die J774-Zellen mit den zu untersuchenden Bakterien beimpft werden. Zunächst wurden 50 ml LB-Medium mit 1 ml der jeweiligen ü.N. Vorkultur auch eine OD_{578 nm} von 0,1 angeimpft und 2 h bei 37 °C bzw. 4 h bei 25 °C inkubiert. In dieser Zeit erreichten die Kulturen die exponentielle Wachstumsphase. Anschließend wurden die 50 ml Kulturen in der Megafuge (Heraeus, Hanau) 10 min bei 4000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 x PBS aufgenommen und auf eine OD_{578 nm} von 0,2 eingestellt. 1 ml dieser Bakteriensuspension wurde zu 9 ml Infektionsmedium (siehe Tabelle 11) gegeben. Das Medium über den J774-Zellen wurde abgesaugt und die Zellen wurden mit 100 µl Infektionssuspension bedeckt. Zusätzlich wurden Kontrollzellen mitgeführt, die identisch zu den Infektionskulturen behandelt wurden. Anstelle der Bakteriensuspension erhielten sie frisches Infektionsmedium. Direkt im Anschluß wurden die 96 Well Platten für 2 min bei 500 rpm in der Megafuge (Heraeus, Hanau) zentrifugiert um die Bakterien auf die Zellen zu sedimentieren. Die Platten wurden standardmäßig für 3 h bei 37 °C bebrütet um die Infektion der Makrophagen durch die Bakterien zu ermöglichen. Bei temperaturabhängigen Virulenztests fand die Infektion zusätzlich bei 25 °C für 3 h statt.

Die 96 Well Mikrotiterplatten wurden nach Ablauf der Inkubationszeit dreimal mit Zellkultur-medium gewaschen. Anschließend wurden 100 µl einer Tobramycinlösung (500 µg/ml in Zellkulturmedium, Stammlösung 50 mg/ml, Sigma, Deisenhofen)) auf die Zellen gegeben um die verbliebenen Bakterien abzutöten und die Infektion der J774-Zellen abzustoppen. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C im Inkubator wurde die Tobramycinlösung abgesaugt und durch 100 µl der 3 – (4,5 – *Dimethylthiazol* – 2 – *yl*) – 2,5 – *diphenyltetrazolium* – *bromid* (MTT) Lösung ersetzt (Tabelle 11). Zusätzlich wurden 2 Wells des Verdunstungsschutzes abgesaugt und für die Leerwertbestimmung ebenfalls mit MTT Lösung befüllt. Nach 60 bis 90 min Inkubation bei 37 °C (5 % CO₂) wurden die Platten im Mikrotiterplattenleser (Fusion, Packard Biosciences, Meriden) bei 600 nm vermessen. Zur Auswertung des Tests wurde der Leerwert der beiden Wells von den Messwerten abgezogen. Die Messerte wurden zu den nicht infizierten Kontrollzellen ins Verhältnis gesetzt. Bei 70-100 % überlebender Makrophagen liegt nur eine sehr geringe Cytotoxizität vor. Bei 30-70 % liegt eine ExoS Aktivität vor und bei unter 30 % überlebenden Makrophagen besitzen die Bakterien eine ExoU Aktivität (Hogardt *et al.*, 2007). Die untersuchten *P. aeruginosa* Stämme konnten so einer ExoU oder ExoS Aktivität zugeordnet werden.

2.2.8 Serogruppentypisierung

P. aeruginosa Stämme können in 16 unterschiedliche Serogruppen unterteilt werden. Zu welcher Serogruppe ein Stamm gehört, kann mit Hilfe von 16 monovalenten Seren (P1-P16, Biorad, München) bestimmt werden. Um die Einteilung vorab eingrenzen zu können, gibt es vier polyvalente Antikörper-Seren (PMA, PME, PMC, PMF; Biorad, München). Um die klinischen *P. aeruginosa* Isolate ihren Serogruppen zuzuordnen, wurden viermal 10 μ l einer 0,9 %igen NaCl Lösung auf einen Objektträger gegeben. Mit einer Impfpöse wurde ein wenig Material aus einer Einzelkolonie des zu untersuchenden Stammes im Tropfen resuspendiert. Auf diese Suspensionen wurde wiederum ein Tropfen Antikörper-Gemisch gegeben, um eine Vorabenteilung der Serogruppe zu ermöglichen. Eine positive Reaktion zeigt sich im Verklumpen der zuvor homogenen Bakteriensuspension. Anschließend konnten die einzelnen Serogruppen der positiven Untergruppe getestet werden und so die zutreffende Serogruppe bestimmt werden. Zusammensetzung der polyvalenten Seren:

- PMA: P1, P3, P4, P6
- PME: P2, P5, P15, P16
- PMC: P9, P10, P13, P14
- PMF: P7, P8, P11, P12

2.3 Biochemisch analytische Methoden

2.3.1 Bestimmung von Pyocyanin und Pyoverdin in *P. aeruginosa* Kulturen

Zur Bestimmung der von *P. aeruginosa* gebildeten Pigmente Pyocyanin und Pyoverdin wurden pro Stamm 1 ml steril filtrierter, zellfreier Überstand (LB-Kultur, 24 h, 37 °C, 200 rpm) mit Chloroform ausgeschüttelt. Dazu wurden 250 μ l Chloroform zum Überstand gegeben, und nach 2 minütigem vortexen 5 Minuten (13.000 rpm, Eppendorf fresco Tischzentrifuge) zentrifugiert. Die obere, chloroformhaltige Phase wurde abgenommen und die untere, wässrige Phase wurde erneut mit 250 μ l Chloroform versetzt. Dieser Vorgang wurde viermal wiederholt. Das hydrophobe Pyocyanin wurde in der organischen Phase (Chloroformphase) angereichert und konnte mittels Absorptionsmessung im Photometer bei 695 nm gegen Chloroform bestimmt werden. Das in der

wässrigen Phase verbliebene hydrophile Pyoverdin wurde fluorimetrisch bei einer Anregungswellenlänge von 400 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm bestimmt (Cox und Adams, 1985).

2.3.1.1 Proteinbestimmung mittels BCA-Test

Der Proteingehalt einer Probe wurde mittels *Biciconinic acid* (BCA) Test der Firma Sigma (Deisenhofen) ermittelt. Zur Erstellung einer Kalibrierreihe für diesen Test wurden in unterschiedlichen *bovine serum albumine* (BSA)-Konzentrationen acht Lösungen zwischen 0 $\mu\text{g/ml}$ (nur Puffer) und 5000 $\mu\text{g/ml}$ BSA in 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer hergestellt und wie folgt vermessen. Abbildung 3 zeigt die für den BCA Test erstellte Kalibrierreihe.

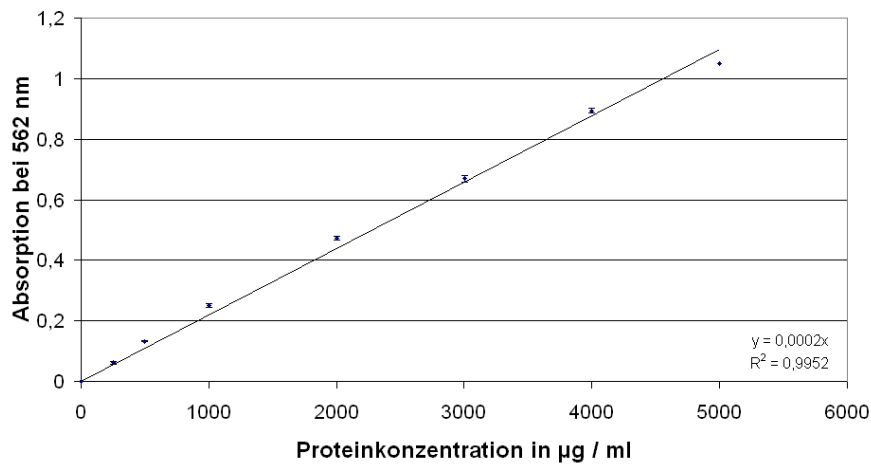


Abbildung 3: Kalibrierreihe für BCA-Test

Es wurden jeweils 60 μl der Zellsuspension mit 150 μl 2 M NaOH und 300 μl destilliertem Wasser versetzt, für eine Stunde bei 70 °C im Thermoblock inkubiert und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Während der Inkubationszeit wurde die BCA-Färbelösung wie folgt hergestellt: 50 Teile A (Biciconinic acid solution, Sigma) + 1 Teil B (Copper (II) sulfate, Sigma).

Von der abgekühlten Probe wurden 50 μl in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml der frisch angesetzten BCA-Färbelösung versetzt. Nach 15-minütiger Inkubationszeit bei 65 °C wurden die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt und bei 562 nm photometrisch vermessen. Der Proteingehalt der Zellsuspensionen wurde anhand der BCA-Kalibrierreihe und mit Hilfe der Geradengleichung berechnet.

2.3.1.2 Proteinbestimmung mittels Lowry-Test

Um den Gesamtproteingehalt in steril filtrierten Überständen zu quantifizieren wurde der Lowry Test (Total Protein Kit, Micro-Lowry, Peterson´s modification, Sigma, Steinheim) verwendet. Dieser ist sensitiver als der BCA Test und zur Quantifizierung von Proteinmengen zwischen 0 und 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ geeignet.

Für den Lowry Test wurden 500 μl Probe mit 500 μl Lowry Reagenz versetzt und schüttelnd 20 min (RT, 850 rpm) inkubiert. Nach Zugabe von 250 μl Phenolreagenz wurde der Ansatz nochmal gemischt und nach 30 min (RT) Inkubationszeit wurde die Absorption bei 750 nm gegen Wasser gemessen. Zur Leerwertbestimmung wurde beim Lowry Test Wasser genauso behandelt wie die Proben. Die Vermessung der Proben erfolgte in Dreifachbestimmung. Für die spätere Quantifizierung der Werte wurde eine Kalibrierreihe für BSA zwischen 0 und 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ mit vermessen. Über die Geradengleichung der linearen Regression der Kalibrierreihe konnte dann der Proteingehalt der Proben berechnet werden.

2.3.2 Photometrische Enzymaktivitätstests

Zur Durchführung von Enzymaktivitätstests wurden zunächst Flüssigkulturen der zu untersuchenden Stämme in Reagenzgläsern mit 5 ml LB-Medium beimpft und bei 37 °C (200 rpm ü.N.) inkubiert. Von diesen Vorkulturen ausgehend wurden am folgenden Tag 5 ml AUM oder 1:10 LB in Reagenzgläsern auf eine $\text{OD}_{578\text{ nm}}$ von 0,05 angeimpft. Die Inkubation der Kulturen erfolgte bei 200 rpm bis zur stationären Phase (18 h bei 37 °C oder für 22 h bei 25 °C). Die Kulturen wurden sterilfiltriert (Porendurchmesser = 0,2 μm , Sarstedt, Nümbrecht) und bei 4 °C gelagert. Der zellfreie Überstand der Kulturen wurde bei Bedarf für die einzelnen Enzymaktivitätstests in 0,14 M NaCl-Lösung verdünnt. Für die Durchführung der Aktivitätstests benötigte Lösungen und Puffer sind in Tabelle 12 aufgeführt.

2.3.2.1 Test auf extrazelluläre Protease

Die Aktivität von extrazellulären Proteasen wurde mit Hilfe des Protease-Aktivitätstests nach einer modifizierten Methode von Prestidge *et al.*, 1971 ermittelt (Tielen, 2005). Das Prinzip dieses Nachweises beruht auf der enzymatischen Hydrolyse von Azocasein (Sigma, Deisenhofen) durch vorhandene Proteasen. Das als Substrat eingesetzte Azocasein wird dabei in kleinere Peptide gespalten. Dabei wird der kovalent

Tabelle 12: Lösungen und Puffer für photometrische Enzymaktivitätstests

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
1 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,0) mit HCl auf pH 8,0 einstellen	157,6 g Tris
10 M NaOH	39,99 g NaOH ad 100 ml dH ₂ O
2 % (w/v) Azocasein	1 g Azocasein (Sigma, Deisenhofen) ad 50 ml dH ₂ O
50 mM Sörensen-Phosphatpuffer (pH 8.0)	
Lösung 1	8,9 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O ad 1 l dH ₂ O
Lösung 2	0,68 g KH ₂ PO ₄ ad 100 ml dH ₂ O
auf 94,5 ml Lösung 1 werden 5,5 ml Lösung 2 gegeben.	
7%ige (v/v) Perchlorsäure	11,67 ml Perchlorsäure (60 %ig, [v/v]) 88,33 ml dH ₂ O
0,14 M NaCl	8,18 g NaCl ad 1 l dH ₂ O

gebundene Azofarbstoff frei, welcher eine Orangefärbung aufweist und bei 430 nm photometrisch quantifiziert werden kann.

Zur Durchführung des Protease-Aktivitäts-Nachweises wurden 150 µl zellfreier Überstand mit 50 µl 1 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,0) und 50 µl H₂O vermischt und für 5 min bei 30 °C erwärmt. Nach Zugabe von 250 µl 2 %iger (w/v) vertemperierten Azocaseinlösung erfolgte eine 15-minütige Inkubation der Proben bei 30 °C und 500 rpm (Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg). Im Anschluss wurde 1 ml eiskalte, 7 %ige (v/v) Perchlorsäure hinzugefügt und das Gemisch für 4 min bei 10.000 rpm (MiniSpin, Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und mit 150 µl 10 M NaOH-Lösung versetzt. Es erfolgte eine photometrische Vermessung der Proben bei 430 nm. Der Versuch wurde in Doppelbestimmung durchgeführt. Als Kontrolle diente hierbei eine 0,14 M NaCl-Lösung, welche wie die Proben behandelt wurde. Eine Enzymeinheit (EU) extrazellulärer Protease wurde als diejenige Aktivität in 1 ml definiert, welche innerhalb von 60 min eine $\Delta A_{430} = 1$ verursachte (Obernesser *et al.*, 1981).

2.3.2.2 Test auf extrazelluläre Lipase

Die Lipase-Aktivität wurde durch die hydrolytische Spaltung von p-Nitrophenylpalmitat (pNPP, Sigma, Deisenhofen) bestimmt. Der Test basiert dabei auf einer enzymkatalytischen Spaltung, wobei es zur Bildung von p-Nitrophenol kommt. Dieses weist

eine gelbliche Färbung auf und kann daher photometrisch vermessen werden. Für den Lipase-Test wurde zunächst eine Substratemulsion angefertigt. Dazu wurden 30 mg pNPP in 10 ml Isopropanol unter leichtem Erwärmen gelöst. Die anschließend wieder abgekühlte Lösung wurde zu 90 ml 50 mM Sörensen-Phosphat-Puffer (pH 8,0) gegeben, in dem zuvor 207 mg Na-Desoxycholat und 100 mg *Gummi arabicum* gelöst wurden. Die fertige Emulsion wurde lichtgeschützt aufbewahrt und innerhalb von 2 h verbraucht. Jeweils 2,4 ml dieser Substratemulsion wurden in Reagenzgläser überführt und für 3 min im 37 °C Wasserbad inkubiert. Im Anschluss wurden 200 µl des Überstandes hinzugefügt, intensiv vermischt und die A_{410nm} bestimmt (T_0). Die Proben wurden für 15 min bei 37 °C im Dunkeln inkubiert, bevor erneut die A_{410nm} ermittelt wurde (T_{15}). Als Kontrolle diente eine 0,14 M NaCl-Lösung anstatt der Probe, die Durchführung erfolgte jeweils in Doppelbestimmung. Eine Absorptionszunahme von 1,0 bei 410 nm in 15 min entsprach einer Lipase-Aktivität von 48,3 nmol/min x ml Probe (Tielen, 2005).

2.3.3 Quantitativer Nachweis von Uronsäuren

Die *P. aeruginosa* Laborstämme PAO1 und PA14 wurden auf ihre Alginatproduktion hin untersucht. Dazu wurde von den Stämmen eine 5 ml LB-Kultur 24 h (37 °C, 200 rpm) inkubiert und steril filtriert. Die Uronsäurebestimmung wurde nach Blumenkrantz und Asboe-Hansen, 1973 wie folgt durchgeführt:

200 µl sterilfiltrierter Überstand wurden in einem Reagenzglas vorgelegt und auf Eis gestellt. Nach der Zugabe von 1,2 ml Lösung 1 (12,5 mM Tetraborat in konz. Schwefelsäure) wurden die Proben 10 min auf Eis inkubiert, gemischt und nachfolgend 5 min bei 100 °C im Wasserbad erhitzt. Anschließend wurden die Proben für 5 min auf Eis gekühlt, mit 20 µl Lösung 2 (0,15 % (w/v) 3-Hydroxybiphenyl in 0,5 % (w/v) NaOH; täglich frisch ansetzen) vermischt, und weitere 5 min bei RT inkubiert. Direkt im Anschluss wurden die Proben photometrisch bei 520 nm gegen dH₂O vermessen. Als Standard dienten Stammlösungen mit 0-200 µg/ml gereinigtem Baktreinalginat von *P. aeruginosa* FRD1. Jede Probe wurde als Dreifachbestimmung angesetzt und vermessen. Als Leerwert diente dH₂O, welches wie die Proben behandelt wurde.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Restriktion von DNA erfolgte mittels Restriktionsendonukleasen von NEB in den entsprechenden Restriktionspuffern nach Angaben des Herstellers. Die Inkubationsdauer betrug zwischen 1 und 2 h bei 37 °C. Generell wurden jeweils 1 U Enzym pro μg DNA eingesetzt.

2.4.2 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch mit Hilfe von Agarosegelen aufgetrennt. 10 μl eines Restriktionsansatzes (Kapitel 2.4.11) wurden mit 3 μl 5x Probenpuffer versetzt, auf ein 1,5 % Agarosegel (1,5 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer, siehe Tabelle 2) aufgetragen und bei 100 V aufgetrennt. Als Größenvergleich diente der DNA-Marker *Gene Ruler DNA Ladder Mix* (SM0331, Fermentas). Zur Visualisierung der DNA wurde das Gel, im Anschluss an die Elektrophorese, für 15 - 20 Minuten mit Ethidiumbromidlösung (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) inkubiert und die DNA-Banden unter UV-Belichtung bei 266 nm dokumentiert.

2.4.3 Grundlagen für die Isolation von RNA

Für die Isolation von RNA wurden alle verwendeten Lösungen und Gebrauchsgegenstände zuvor 2-fach autoklaviert. Steril zu filtrierende Lösungen wurden mit 2-fach autoklaviertem Wasser angesetzt und in 2-fach autoklavierte Flaschen filtriert (Porendurchmesser = 0,2 μm , Sarstedt, Nümbrecht). Die verwendeten Chemikalien und Lösungen wurden RNase-frei bezogen und es wurde nur mit RNase-freien Geräten gearbeitet. Hierfür wurden diese entweder ebenfalls 2-fach autoklaviert oder durch Spülen mit einer 1 M NaOH-Lösung von möglichen RNAsen befreit. Alle Arbeitsschritte erfolgten, wenn nicht anders angegeben, auf Eis.

2.4.4 Zellernte für die RNA-Isolierung

Für die RNA-Isolierung wurde jedes mal frisch aus einer Glycerin-Gefrierkultur (-80 °C) eine ü.N. Vorkultur in LB-Medium (37 °C, 200 rpm) angeimpft. Ausgehend von

dieser Vorkultur wurden 50 ml LB-Medium (in 300 ml Erlenmeyerkolben mit dreifach Schikane) auf eine $OD_{578\text{ nm}}$ von 0,05 angeimpft. Die Kulturen wurden bei 200 rpm und 37 °C bzw. 25 °C inkubiert und zu definierten Zeitpunkten geerntet. Die genauen Zeitpunkte sind in Tabelle 13 aufgeführt.

Tabelle 13: Zeitpunkte zur Ernte von RNA

Kultivierungsart	Wachstumsphase	Temperatur	Zeit der Kultivierung
Planktonisch, aerob	Exponentiell	37 °C	2 h
	Exponentiell	25 °C	4 h
	Stationär	37 °C	18 h
	Stationär	25 °C	22 h
Filterbiofilm, aerob	Beginn Stationärphase	37 °C	20 h
anaerob	Beginn Stationärphase	37 °C	4 d

Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen bis zu einer $OD_{578\text{ nm}}$ von 0,3-0,5 in 15 ml eiskaltem Killing Puffer (siehe Tabelle 14) verdünnt, kurz vermischt und anschließend für 10 min bei 4.000 rpm und 4 °C zentrifugiert (Megafuge, 1.0 R, Heraeus, Hanau). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben wurden entweder direkt zur weiteren Aufbereitung verwendet oder für wenige Stunden bei -20 °C zwischengelagert.

Tabelle 14: Lösungen für die RNA Präparation

Lösung	Komponente	Konzentration
Killing-Puffer	Tris-HCl	20 mM
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	5 mM
mit HCl auf pH 7,5 einstellen		
Saccharose/NaAcetat	Saccharose	0,3 M
	NaAcetat (pH 4,5-5,2)	10 mM
sterilfiltrieren		
SDS/NaAcetat	SDS	2 % (v/v)
	NaAcetat (pH 4,5-5,2)	10 mM
sterilfiltrieren		
NaAcetat		3 M
Mit Essigsäure auf pH 4,5-5,2 einstellen, 2x autoklavieren.		
Lagerungspuffer	Tris/HCl, pH 7,0	40 mM
	MgCl ₂	6 mM

2.4.5 RNA-Präparation

Zur RNA-Präparation wurde zunächst das in flüssigem Stickstoff eingefrorene Zellpellet kurz in der Hand aufgetaut und in 125 µl Saccharose/NaAcetat-Lösung (Tabelle 21)

resuspendiert. Die Suspension wurde in ein leeres, vorgekühltes Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 125 μ l SDS/NaAcetat-Lösung wurden die Proben invertiert und für 1 min bei 65 °C und 850 rpm (Thermoschüttler, Thermo Scientific) inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben mit 400 μ l Phenol (65 °C) versetzt und für 3 Minuten schüttelnd (850 rpm, Thermoschüttler) bei 65 °C inkubiert, wobei jede Minute intensiv gemischt wurde. Im Anschluss wurden die Proben für 30 s in flüssigem Stickstoff eingefroren. Es folgte eine 10 minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm und RT (MiniSpin, Eppendorf, Hamburg). Der Phenolschritt wurde wiederholt. Anschließend wurde der Überstand zu 400 μ l Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) gegeben und intensiv gemischt. Die Suspension wurde 2 min bei RT zentrifugiert (13.000 Upm, MiniSpin, Hamburg). Auch dieser Schritt wurde wiederholt. Die wässrige Phase wurde zu 400 μ l Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) gegeben, intensiv gemischt, 2 min zentrifugiert und der Überstand wurde zu 1 ml Ethanol und 40 μ l 3 M NaAcetat (Tabelle 14) gegeben. Die RNA wurde anschließend bei -20 °C (mind 2 h oder ü.N.) aus der Lösung gefällt.

2.4.6 RNA Aufreinigung und Qualitätskontrolle

Zur Aufreinigung wurde die gefällte RNA abzentrifugiert (10 min, RT, 13.000 rpm, MiniSpin), das Pellet mit 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 μ l Aufbewahrungspuffer gelöst. Es folgte die Aufreinigung mittels RNeasy Kit (Quiagen, Hilden), wobei die RNA auf der Säule einem DNase Verdau nach Herstellerangaben unterzogen wurde. Eluiert wurde mit 30 μ l RNase freiem Wasser. Mittels Nanodrop (Thermo Scientific, Wilmington, USA) wurde anschließend die Konzentration und die Reinheit der RNA bestimmt.

Zur weiteren Überprüfung der RNA wurde diese mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Hierfür wurde ein RNase-freies 1 %iges (w/v) Agarosegel hergestellt (siehe Tabelle 15). 10 μ g der RNA in 10 μ l Wasser (MilliQ), sowie 10 μ l des Markers (RNA Molecular Weight Marker, Roche, Mannheim) wurden anschließend 1:1 mit Probenpuffer (Tab: 15) versetzt und für 10 min auf 65 °C erhitzt. Die Proben wurden auf Eis überführt und auf das Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 4 °C und 100 V für 4-5 h. Das Gel wurde im Anschluss für 5 min mit Ethidiumbromid-Lösung gefärbt und ü.N. zum Entfärben im Laufpuffer aufbewahrt (Tabelle 15). Am nächsten Tag wurde das Gel über die Geldokumentationsanlage (GelDoc, Biorad, München) analysiert.

Tabelle 15: Lösungen für RNA Gelelektrophorese

Lösung	Komponente	Konzentration
10 x MOPS-Puffer	NaAcetat	4,1 g/l
	EDTA	3,7 g/l
In dH ₂ O lösen und 2 x autoklavieren		
MOPS	MOPS	41,85 g/l
	NaOH	5 g/l
Mit 5 N NaOH auf pH 7,0 einstellen, sterilfiltrieren, lichtgeschützt lagern.		
Probenpuffer	Formamid	6,5 ml
	Formaldehyd	1,2 ml
	10x MOPS	2 ml
	Saccharose	50 %ige (w/v), 0,4 ml
	Bromphenolblau	1 Spatelspitze
Zu 190 μ l aliquotieren und bei -20 °C lagern		
Laufpuffer	10 x MOPS-Puffer	100 ml
	dH ₂ O	900 ml
RNA-Agarosegel	Agarose	1,5 g
	dH ₂ O	127,8 g
Aufkochen und abkühlen lassen		
	10 x MOPS	15 ml
	Formaldehyd	7,25 ml
ad 150 ml		
Ethidiumbromid-Lösung	Ethidiumbromid	1 ml
	1 x MOPS-Puffer	1 l
Lichtgeschützt und kühl lagern		

Alternativ wurde die RNA, wenn sie für Microarrays verwendet werden sollte, mittels Bioanalyzer (2100 Expert, Agilent, USA) auf deren Qualität hin untersucht. Hierzu wurden die Proben auf eine Konzentration zwischen 50 und 500 ng RNA/ μ l eingestellt, 2 min bei 70 °C denaturiert und anschließend auf Eis gelagert. Zur Analyse wurden *Procaryote Total RNA Nano Chips* (Agilent, Santa Clara, USA) verwendet.

2.4.7 Reverse Transkription (cDNA Synthese)

Die Umschreibung der RNA in komplementäre DNA (cDNA) erfolgte mittels reverser Transkriptase. Dafür wurden 10 ng der Gesamt-RNA mit 10 μ l *Random Primer* (Fouts *et al.*, 2002, 75 ng/ μ l; Invitrogen, Karlsruhe) vermischt und der Ansatz mit Wasser (MilliQ) auf 30 μ l aufgefüllt. Die Weiterbehandlung der Proben erfolgte nach dem Protokoll, welches in Tabelle 16 beschrieben ist.

Tabelle 16: cDNA Synthese

Komponente	Menge
RNA	10 μ g
<i>Random Primer</i> , Invitrogen, Karlsruhe	10 μ l
Mit dH ₂ O auf 30 μ l auffüllen.	
5 x First strand buffer, Invitrogen, Karlsruhe	12 μ l
DTT, 100 mM, Invitrogen, Karlsruhe	6 μ l
dNTPs, 10 mM, GE Healthcare, München	3 μ l
Suprase Inhibitor, 20 U/ μ l, Ambion, Foster City, USA	1,5 μ l
Superscript, 200 U/ μ l, Invitrogen, Karlsruhe	7,5 μ l
Gesamtansatz	60 μ l

Nachdem alle Komponenten zusammen gemischt waren, wurden sie im Thermocycler (C1000, Biorad) wie folgt (Tabelle: 17) erhitzt:

Tabelle 17: cDNA Programm

Temperatur	Zeit	Funktion
70 °C	10 min	Aufschmelzen der Sekundärstruktur
25 °C	10 min	Anlagerung der Primer
12 °C	Pause	Zugabe der weiteren Reaktionskomponenten
25 °C	10 min	
37 °C	60 min	
42 °C	60 min	
70 °C	10 min	Inaktivierung der Reaktion, Denaturierung von RNA/cDNA Hybriden
12 °C	Pause	Ende der PCR

Um die RNA aus der cDNA zu entfernen wurde die Probe mit 20 μ l 1 M NaOH versetzt und 30 min bei 65 °C inkubiert. Zur Neutralisation wurden anschließend 20 μ l 1 M HCl zugegeben. Die Aufreinigung erfolgte mittels PCR Purification Kit von Qiagen (Hilden) nach deren Protokoll. Eluiert wurde erst mit 30 μ l Elutionspuffer, der vor der Zentrifugation 1 min auf der Säule belassen wurde. Dieser Schritt wurde mit weiteren 15 μ l wiederholt. Die aufgereinigte cDNA wurde mittels Nanodrop vermessen. Benötigt wurden ca 70 ng/ μ l cDNA pro Microarray.

2.4.8 Probenpräparation für *Affymetrix GeneChip*

Für die GeneChips® *P. aeruginosa* von Affymetrix werden cDNA Fragmente zwischen 50 und 200 bp benötigt. Daher wurde die cDNA mit Hilfe einer DNase verdaut. Um die einzusetzende Konzentration zu ermitteln, wurden vier Testverdau mit je 10 μ l cDNA und vier unterschiedlichen DNase Konzentrationen (0,9 U - 1,2 U) durchgeführt (siehe Tabelle 18).

Tabelle 18: cDNA Fragmentierung

Komponente	Testverdau	Probenverdau
10 x <i>One Phor All</i> Puffer	1,25 μ l	5 μ l
cDNA	10 μ l	40 μ l
DNase	x μ l (z.B. 1,1 U/ μ g eingesetzte cDNA)	
dH ₂ O	y μ l (auf Gesamtvolumen auffüllen)	
Gesamtansatz	12,5 μ l	50 μ l

Bei der verwendeten DNase stellten sich 1,1 U DNase pro μ g cDNA für 10 min bei 37 °C als geeignet heraus. Anschließend wurde die DNase für 10 min bei 98 °C inaktiviert. Die Fragmentierungen wurden auf einem 15 %igen TBE-Acrylamidgel überprüft, indem 10 μ l des Verdauansatzes mit 2 μ l Ladepuffer (Fermentas, St.Leon-Rot) versetzt, und für 90 min bei 100 V aufgetrennt wurden. Zur Größenkontrolle diente die Hyperladder V von Bionline. Die Gele wurden für 10 min in SybrGold (Invitrogen, Karlsruhe; 10 μ l in 100 ml H₂O) gefärbt und an der Geldokumentationsanlage fotografiert.

Nach einem erfolgreichen Testverdau wurde der Gesamtansatz (40 μ l cDNA) verdaut (Tab: 18). Das Ergebnis wurde wie oben beschrieben überprüft. Waren alle Proben korrekt fragmentiert, folgte das *Terminal labeling*. 36 μ l der fragmentierten cDNA wurden mit Biotin markierten ddUTPs mit Hilfe der Terminalen Deoxynucleotid Transferase 60 min bei 37 °C markiert (abstoppen mit 2 μ l einer 0,5 M EDTA Lösung, pH 8,0). Final wurde die Markierung mit Hilfe eines Neutravidin Shifts überprüft. Hierzu wurden

Tabelle 19: 15 %iges Polyacrylamid Gel

Komponente	Menge
Acrylamid	3,75 ml
5 x TBE	2 ml
H ₂ O	4,25 ml
TEMED	16 μ l
APS (10 %)	66 μ l
5 x TBE	
Tris base	54 g
Borsäure	27,5 g
EDTA (0,5 M; pH 8,0)	20 ml

5 μ l markierte cDNA mit 5 μ l Neutravidin Lösung (400 μ g in 100 μ l 50 mM Tris-HCl, pH 7,0) versetzt, 5 min bei RT inkubiert und auf einem TBE-Acrylamidgel überprüft. War auch dieser Schritt erfolgreich wurden die Proben auf ein finales Volumen von 51 μ l aufgefüllt und zur Hybridisierung und Weiterverarbeitung an das Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung (HZI, Braunschweig) zu Petra Hagendorff gebracht. Die Microarrays wurden am HZI vermessen und anschließend von Maurice Scheer (Institut für Bioinformatik und Biochemie, TU Braunschweig) prozessiert. Anschließend konnte die Auswertung erfolgen.

2.4.9 Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time PCR (qPCR) beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR, erlaubt jedoch parallel dazu die Quantifizierung der gewonnenen DNA. Die Menge an gebildeter DNA wird dabei über Fluoreszenz-Marker bestimmt. Das Fluoreszenzsignal wird folglich stärker, je mehr doppelsträngige DNA amplifiziert wurde. In dieser Arbeit wurde EvaGreen[®] (Bio-Rad) als Marker verwendet. Für die Durchführung der qPCR wurde der in Tabelle 20 beschriebene Reaktionsansatz verwendet. Das Protokoll ist in Tabelle 21 aufgeführt.

Tabelle 20: qPCR Ansatz

Komponente	Volumen
Sso FastTM EvaGreenR Supermix (Bio-Rad)	10 μ l
Template, 10 ng/ μ l	1 μ l
Primer I, 10 pmol/ μ l	1 μ l
Primer II, 10 pmol/ μ l	1 μ l
H ₂ O (MilliQ)	7 μ l
Gesamtansatz	20 μ l

Tabelle 21: qPCR Programm

Temperatur	Zeit
98 °C	3 min, 30 sec
98 °C 5 sec	} 34 x
59,1 °C 15 sec	
60 °C 15 sec	
98 °C	10 sec
Schmelzkurve	65 °C \longrightarrow 95 °C 0,5 °C Anstieg, 5 sec, Platte lesen

Alle Ansätze der zu untersuchenden Proben erfolgten in Triplica-Bestimmungen. Referenzproben mit den konstitutiv exprimierten Genen *gyrB* und *rpoD* wurden als Einfachbestimmungen mitgeführt. Die Primerpaare *gyrB*-fw1/bw1, *rpoD*-fw1/bw1, *exoS*-fw1/bw1 sowie *exoU*-fw1/bw1 sind 18 bp lang und liegen direkt im zu amplifizierenden Gen. Die Fragmentgröße liegt bei allen Primerpaaren zwischen 100 und 150 bp, mit einem GC-Gehalt von ca. 60 %. Bei *gyrB* handelt es sich um eine DNA Gyrase. Sie gehört zu den Topoisomerasen und ist für das supercoiling der DNA verantwortlich, welches für die Replikation unerlässlich ist. Sie wird in Bakterien konstitutiv transkribiert und ist somit ein geeignetes Kontrollgen für die qPCR. Zur weiteren Kontrolle diente das *rpoD* Gen. RpoD ist ein transkriptioneller Regulator der σ -70 Familie und konstitutiv aktiv in *P. aeruginosa*. ExoS und ExoU sind Effektorproteine des Typ III Sekretionssystems von *P. aeruginosa* (siehe Kapitel 1.6) und kommen in der Regel nicht gemeinsam in einem Organismus vor. So besitzt PAO1 das ExoS und PA14 das ExoU Protein. In der qPCR wurde die Expression dieser Effektorproteine unter Temperatureinfluss untersucht (siehe Kapitel 3.5.3).

Als zusätzliche Kontrollen wurden ebenfalls mitgeführt: Positivkontrolle (Wildtyp), Negativkontrolle (Wasser, MilliQ), Negativkontrolle ohne cDNA (No-Template-Control, NTC) sowie eine Negativkontrolle mit mRNA (No-Reverse-Transkriptase, NRT). Bei den NTC-Proben wurde an Stelle des Templates ebenfalls Wasser (MilliQ) verwendet.

Die Auswertung der qPCR Daten erfolgte mit dem Programm CFX Manager (Bio-Rad, München). Folgende Grundeinstellungen wurden für die Darstellung der Daten verwendet:

- Normalisierte Expression
- Relativ zu Null

- x-Achse = Probe
- y-Achse = linear
- Skalierung = niedrigste
- Fehler-Typ = Standardfehler
- Chart error bar multiplier = 1 Standardabweichung

2.4.10 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR dient der schnellen und einfachen Überprüfung der Genproduktion von Bakterienkolonien. Zur Durchführung der Kolonie-PCR wurde etwas Material aus einer Einzelkolonie entnommen und in 20 μl Lysis-Puffer (siehe Tabelle 22) resuspendiert. Nach 15 min bei 95 °C lagen die Zellen denaturiert vor. Die Suspension wurde mit 180 μl Wasser (MilliQ) verdünnt, bei -20 °C eingefroren und als Template für die PCR verwendet.

Tabelle 22: Zusammensetzung: Lysis-Puffer

Komponente	Konzentration
SDS	0,25 % (v/v)
NaOH	50 mM
in MilliQ Wasser	

Der typischerweise verwendete PCR Ansatz setzte sich wie in Tabelle 23 beschrieben zusammen und wurde unter der Verwendung des in Tabelle 24 beschriebenen Programms gefahren.

Im Anschluss an die PCR wurden 5 μl Ansatz mit 1 μl Ladepuffer versetzt und auf ein 1,5 %iges (w/v) Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese verlief bei 100 V, ca 60

Tabelle 23: PCR Ansatz

Menge	Komponente
0,2 μl	Phusion (2 U/ μl , NEB)
1 μl	Primer 1 (10 pM, z.B. oPT01)
1 μl	Primer 2 (10 pM, z.B. oPT02)
2 μl	dNTP's (2,5 mM)
4 μl	5 x GC-Puffer
9,8 μl	dH ₂ O
2 μl	Lysat

Tabelle 24: PCR Programm

Temperatur	Zeit
95 °C	2,30 min
95 °C 20 sec	34 x
60,9 °C 30 sec	
70 °C 1 sec	
72 °C	10 min

min. Als Referenz dienten 5 μ l der 100 bp Ladder von Fermentas (SM0243) oder NEB (N0467S). Das amplifizierte Fragment der Primer oPT01/ oPT02 hatte eine Größe von 943 bp. Da das *slyA* aus PAO1 zu 99,31 % identisch zu dem *slyA* aus PA14 ist (PA14_20850), konnten die Primer oPT01/02 auch für die *slyA* Amplifikation in PA14 eingesetzt werden. Hier beträgt die Fragmentgröße ebenfalls 943 bp.

2.4.11 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte mittels Mini-Präparation nach der alkalischen Lyse-Methode (modifiziert, Sambrook und Russell, 2001). Die verwendeten Puffer sind in Tabelle 25 aufgelistet.

Tabelle 25: Puffer für die Plasmid-DNA-Minipräparation

Puffer	Zusammensetzung
P1	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 10 mM EDTA 100 μ g/ml RNaseA, frisch dazugeben
P2	200 mM NaOH 1 % SDS (w/v)
P3	3 M Na-Acetat (pH 5.5)

Dazu wurden 5 ml Kulturen der Klone in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotikazusätzen bei 37 °C und 200 rpm über Nacht inkubiert. 1 ml der Kulturen wurden zentrifugiert (13000 rpm; 2 min; 4 °C; Biofuge fresco, Heraeus) und das Bakteriensediment wurde in 300 μ l Puffer P1 (siehe Tabelle 25) resuspendiert. Nach Zugabe von 300 μ l Puffer P2 (siehe Tabelle 25) und vorsichtigem Invertieren, wurde 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden 300 μ l Puffer P3 (siehe Tabelle 25) zugegeben und vorsichtig gemischt. Die durch den Zellaufschluss freigewordenen Protein-SDS-Komplexe, gefällte chromosomale DNA, sowie Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (13000 rpm; 15 min; RT; Biofuge fresco, Heraeus) sedimentiert. Der Plasmid-DNA enthaltene Überstand wurde nochmals 10 min auf Eis inkubiert und anschließend 15 min mit 13.000 rpm (Biofuge fresco, Heraeus) bei RT zentrifugiert, um die restlichen Proteine aus der Lösung zu entfernen. Zur Ausfällung der Plasmid-DNA wurde der Überstand mit dem 0,7-fachem Volumen Isopropanol gemischt und zentrifugiert (13000 rpm; 15 min; RT; HBiofuge fresco, Heraeus). Der Überstand wurde vollständig entfernt und das DNA-Sediment mit 400 μ l kaltem 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, um die restlichen Salze

zu entfernen. Abschließend wurde der Ansatz noch einmal für 5 min bei 13.000 rpm (Biofuge fresco, Heraeus) zentrifugiert, die Plasmid-DNA wurde luftgetrocknet und in 0,1 x TE-Puffer aufgenommen (siehe Tabelle 2).

Die Lagerung erfolgte bei -20 °C. Nach der Präparation der Plasmid-DNA wurden zur Kontrolle Restriktionsansätze (siehe Kapitel 2.4.1) durchgeführt.

2.4.12 Isolierung von genomischer DNA aus *P. aeruginosa*

Für die Sequenzierung klinischer *P. aeruginosa* Isolate aus Katheter-assoziierten Harnwegsinfektionen (CAUTI) wurde hochmolekulare DNA benötigt. Dazu wurde vom entsprechenden Stamm aus einer -80 °C Glycerin-Gefrierkultur eine LB Vorkultur angeimpft und ü.N. bei 37 °C (200 rpm) bebrütet. Die Hauptkultur wurde ausgehend von der Vorkultur auf eine OD_{578 nm} von 0,05 angeimpft und 4 h (37 °C, 200 rpm) inkubiert. Die Suspension wurde abzentrifugiert (Megafuge Heraeus, Hanau; 20 min, 4000 rpm, RT), der Überstand verworfen und das Pellet in 9,5 ml 0,1 M Tris (pH 8,0) aufgenommen. Nach Zugabe von 500 µl 10 % (w/v) SDS-Lösung und 100 µl Proteinase K (20 mg/ml gelöst in 10 mM CaCl₂) wurde der Ansatz 1 h bei 56 °C inkubiert. Dabei sollte die Suspension klar werden, da die Zellen lysieren. Nach der Zugabe von 1,8 ml 5 M NaCl wurde vorsichtig invertiert und 1,5 ml vorgewärmte CTAB-Lösung zugegeben. Nach 20 min bei 65 °C folgte die DNA Extraktion mittels Phenol-Chloroform Fällung.

Die Bakteriensuspension wurde mit dem gleichen Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCI, 25:24:1) versetzt, kurz intensiv gemischt, und 10-20 min zentrifugiert (4000 rpm, RT, Megafuge, Heraeus). Die untere Phase wurde mit einer Glaspipette abgesaugt und verworfen. Die organische Phase verblieb im Reaktionsgefäß, wurde mit dem gleichen Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (CI, 24:1) versetzt, kurz intensiv gemischt und wieder zentrifugiert (4000 rpm, RT, Megafuge, Heraeus). Nach dem Verwerfen der unteren Phase und der Interphase wurde die Oberphase erneut mit Chloroform-Isoamylalkohol ausgeschüttelt, intensiv gemischt und zentrifugiert (4000 rpm, RT, Megafuge, Heraeus). Die untere Phase wurde verworfen, die obere in ein neues Gefäß überführt (nicht pipettiert, um Scherkräfte zu vermeiden) und die DNA wurde mit gleichem Volumen eiskaltem Isopropanol gefällt. Mit Hilfe einer gebogenen Pasteur-Pipette konnte die DNA zwischen den Phasen aufgespult werden. Die DNA wurde kurz getrocknet und dann in 10 mM Tris/HCl (pH 8,0) ü.N. gelöst.

Die Qualitätskontrolle erfolgte über ein 1%iges Agarosegel, auf das 10 µl DNA aufgetragen wurden. Die DNA wurde bei 100 V 60 min aufgetrennt. Als Standard diente

die *Gene Ruler High Range* DNA Ladder von Fermentas (SM1353). War das Ergebnis zufriedenstellend, wurde ein 0,35 %iges (w/v) Agarosegel angefertigt und die DNA bei 15 V (20 h, 4 °C) elektrophoretisch aufgetrennt. Quantifiziert wurde die DNA mittels Quant-ItTM PicoGreen[®] dsDNA Assay Kit von Invitrogen (Karlsruhe). Abbildung 4 zeigt eine beispielhafte Kalibrierreihe mit PicoGreen[®]. Diese wurde für jede Quantifizierung neu erstellt.

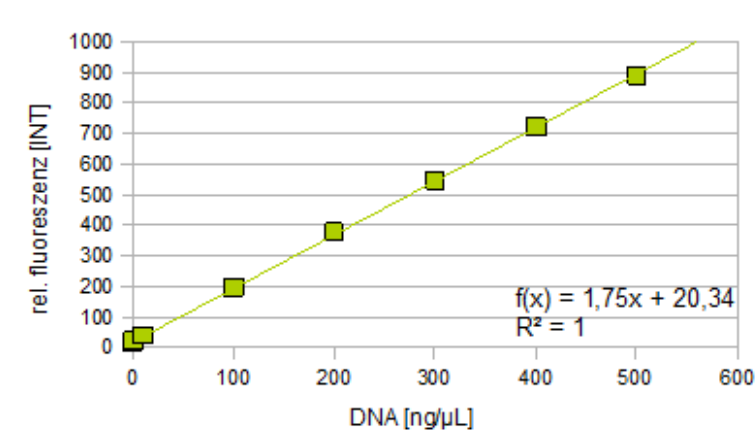


Abbildung 4: Kalibrierung des PicoGreen[®] DNA Quantifizierungsnachweises. Kalibrierreihe zwischen 0 und 500 ng/μl samt Geradengleichung und Korrelationskoeffizient (R).

3 Ergebnisse und Diskussion

Die molekularen Strategien von *P. aeruginosa* Stämmen für eine erfolgreiche Harnwegsinfektion sollten aufgezeigt werden. Dazu sollte zunächst ein geeignetes Anzuchtssystem mit entsprechender Nährstoffversorgung etabliert werden, welches die vorherrschenden Wachstumsbedingungen im Harnweg berücksichtigt. Mit Hilfe dieses Anzuchtssystems sollte im Anschluss die Physiologie von *P. aeruginosa* unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen untersucht werden.

3.1 Simulierung von Harnwegsinfektionen

In dieser Arbeit wurde ein *in vitro*-Koloniebiofilm Anzuchtssystem verwendet, welches die *in vivo* Bedingungen während einer Harnwegsinfektion berücksichtigen und nachstellen sollte. Für die initialen Untersuchungen zur Etablierung dieses Systems wurden zunächst die Referenzstämme *P. aeruginosa* PAO1 und PA14 verwendet (Holloway *et al.*, 1979). Beide in der *P. aeruginosa* Forschung verwendeten Modellstämme stammen ursprünglich aus Brandwunden (Holloway, 1955, Rahme *et al.*, 1995). Im Anschluss an die Etablierung sollte die Physiologie von *P. aeruginosa* Harnwegsisolaten in diesem Anzuchtssystem untersucht werden.

3.1.1 Planktonisches Wachstum von *P. aeruginosa* unter aeroben Bedingungen

Ein entscheidender Faktor für das Wachstum von Bakterien ist ihre Nährstoffversorgung. *P. aeruginosa* bevorzugt als Kohlenstoff- oder Stickstoffquellen kurzkettige Fettsäuren, Aminosäuren, sowie Polyamine (Stanier *et al.*, 1966, Lessie und Neidhardt, 1967, Meile und Leisinger, 1982, Tricot *et al.*, 1994, Frimmersdorf *et al.*, 2010). Glukose kann von *P. aeruginosa* über den Entner-Doudoroff Reaktionsweg ebenfalls verstoffwechselt werden, gehört allerdings nicht zu den bevorzugten Kohlenstoffquellen (Entner und Doudoroff, 1952). Im Harnweg herrschen mikroaerobe Verhältnisse, wobei der Gehalt an gelöstem Sauerstoff im Urin bei gesunden Menschen höher ist (etwa 4,2 ppm) als bei Patienten, die unter einer Harnwegsinfektion leiden (etwa 2,8 ppm,

Sarre, 1938, Giannakopoulos *et al.*, 1997). *P. aeruginosa* bildet im Harnweg einen Biofilm aus, welcher sich an den Harnwegs-Epithelzellen befindet und ständig von Urin umspült wird (Reid *et al.*, 1992). Das ermöglicht den Bakterien, die Nährstoffe größtenteils aus dem Urin zu entnehmen (Asscher *et al.*, 1966, Lees *et al.*, 1980). Der menschliche Urin ist in seiner Zusammensetzung tageszeit- und diätabhängig (Egberts und Soederhuizen, 1996). Um im Labor unter standardisierten Bedingungen arbeiten zu können, wurde ein artifizielles Urin-Medium (AUM) verwendet (Brooks und Keevil, 1997). Es besteht aus Harnstoff, Harnsäure, Zitronensäure, Milchsäure und wenigen Aminosäuren und Spurenelementen, die in Form von Hefeextrakt und Trypton zugegeben werden. Zusätzlich beinhaltet das AUM verschiedene Salze, darunter Ammoniumchlorid als Stickstoffquelle, sowie einen Phosphatpuffer, der das Medium auf pH 6,5 hält (siehe Tabelle 1). Von den vorhandenen Nährstoffen verstoffwechselt *P. aeruginosa* als erstes Aminosäuren und anschließend Zitronensäure, Harnsäure und Milchsäure (persönliche Mitteilung K. Zapf). Obwohl *P. aeruginosa* PAO1 eine aktive Urease besitzt (*ureDABC*), wird Harnstoff nur dann als Stickstoffquelle genutzt, wenn keine Alternativquelle wie Glutamin, Asparagin, Agrinin oder Ammonium vorhanden ist (Jahns, 1992). Auch beim Wachstum von *P. aeruginosa* in AUM verblieb der Harnstoff ungenutzt im Medium (persönliche Mitteilung K. Zapf).

Abbildung 5 zeigt die Wachstumskurve von *P. aeruginosa* PAO1 in AUM und in 1:10 LB.

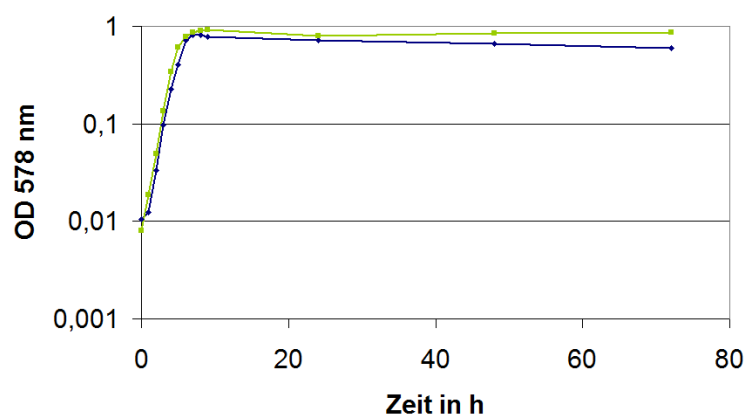


Abbildung 5: Wachstumskurve von *P. aeruginosa* PAO1 aerob, 37 °C, 200 rpm, planktonisch. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Wachstumsexperimenten. Blau: Wachstum in 1:10 LB, grün: Wachstum in AUM.

Zudem wurde von *P. aeruginosa* PAO1 die Wachsrates, sowie die Lebendzellzahl in Kolonie bildenden Einheiten (KBE), in AUM und 1:10 LB bestimmt, um das Wachstum auch in Bezug auf die Generationszeit in beiden Medien vergleichen zu können.

Tabelle 26: Wachsrates (μ) von *P. aeruginosa* PAO1 in AUM und 1:10 LB, maximal erreichte OD bei 578 nm und der Zeitpunkt des Erreichens der maximalen OD_{578 nm}. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Untersuchungen.

Medium	Wachsrates [μ]	max. OD _{578 nm}	erreicht nach (h)	Lebendzellzahl
1:10 LB	0,0180	0,82	7	1,08 x 10 ⁹
AUM	0,0185	0,92	9	1,31 x 10 ⁹

Das Wachstum von *P. aeruginosa* PAO1 in 1:10 verdünntem LB-Medium war dem Wachstum in AUM sehr ähnlich (siehe Tabelle 26). Die Wachsrates lagen bei 0,0180 und 0,0185 μ . Auch die final erreichte OD bei 578 nm war mit 0,82 und 0,92 nahezu identisch. Die erreichte Lebendzellzahl von *P. aeruginosa* PAO1 war in AUM und 1:10 ebenso sehr gut vergleichbar (siehe Tabelle 26). Da die Nährstoffversorgung Einfluss auf die Genexpression hat, wurde zur Untersuchung der Einflüsse von AUM auf das Bakterienwachstum in den weiteren Untersuchungen stets 1:10 LB als Referenzmedium verwendet, da es *P. aeruginosa* PAO1 gleiche Wachstumsbedingungen in Bezug auf Generationszeit und final erreichte optische Dichte (OD) bietet. Beides ist wichtig, um möglicherweise auftretende Quorum Sensing (QS) bedingte Veränderungen der Genexpression ausschließen zu können.

3.1.2 Aerobes Wachstum von *P. aeruginosa* im Koloniebiofilm

Da *P. aeruginosa*, wie in Kapitel 1.2 beschrieben, während Harnwegsinfektionen Biofilme ausbildet, wurden die weiteren Untersuchungen größtenteils mit dem Koloniebiofilm-Anzuchtssystem (siehe Abbildung 6; Anderl *et al.*, 2000, Merrit *et al.*, 2005) durchgeführt. Es handelt sich hierbei um einen relativ einfachen und standardisierten Versuchsaufbau (siehe Abbildung 6), mit dem sich genügend Biomasse für biochemische Analysen wie beispielsweise Transkriptomanalysen gewinnen lässt.

Das Wachstum von Bakterien als Koloniebiofilm kann in vier Stadien eingeteilt werden, was in etwa der theoretischen Vorstellung einer Biofilmbildung entspricht (siehe Kapitel 1.2). Für das Animpfen der Membranfilter wurden 50 μ l aus einer *P. aeruginosa* PAO1 LB-Vorkultur (OD_{578 nm} 5,0, 37 °C, 200 rpm, aerob, ü.N.) auf die Membran aufgetragen (1. Stadium). In diesem Stadium liegen die Bakterien planktonisch vor,

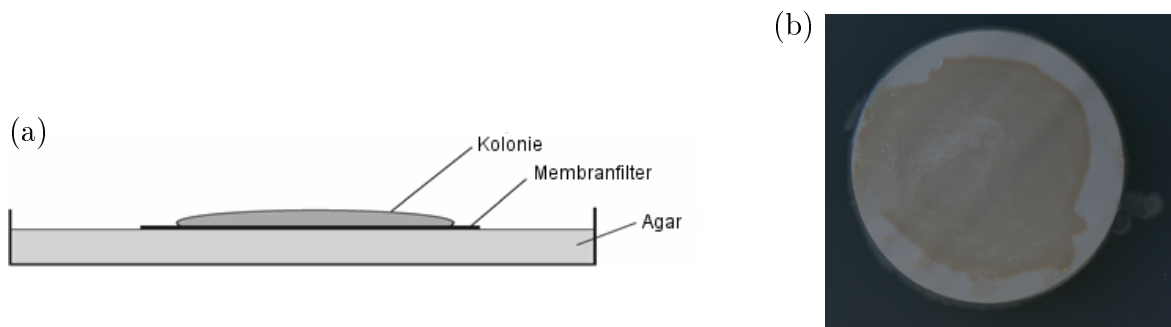


Abbildung 6: Aufbau des Anzuchtssystems für *P. aeruginosa* Koloniebiofilme. (a) Modell für die Koloniebiofilm-Kultivierung nach Anderl *et al.*, 2000. (b) Beispiel für die Morphologie eines 6 d inkubierten Koloniebiofilms von *P. aeruginosa* PAO1 auf einem Membranfilter (\varnothing 2,5 cm). Inkubationsbedingungen: 1:10 LB-Agarplatte, aerob, 37 °C.

werden aber anschließend passiv durch das Whatman Papier (siehe Kapitel 2.2.3.1) auf die Oberfläche gesaugt (2. Stadium). Im 3. Stadium beginnt die Biofilmbildung, indem die Bakterien Mikrokolonien ausbilden und mit der Produktion der Matrix beginnen, die aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) besteht. Mit der Reifung des Biofilms beginnt das 4. Stadium. Im Gegensatz zu den Prozessen im Biofilm an Kathetermaterial oder auch Epithelzellen, kommt es jedoch nicht zur Ablösung von Teilen des Biofilms, da die Bakterien nicht von Medium umspült werden und so keine Scherkräfte auf sie einwirken. Die Bakterien im Biofilm beziehen ihre Nährstoffe aus der Agarplatte unterhalb des Membranfilters, was einen umgekehrten Nährstoffgradienten im Gegensatz zum Schlauch-Biofilmmodell an der Phasengrenze fest/flüssig (siehe Kapitel 1.2) zur Folge hat. Die Sauerstoffversorgung verläuft im Koloniebiofilm entgegengesetzt zur Nährstoffzufuhr, da der Sauerstoff von oben an den Biofilm gelangt. Dieses Anzuchtssystem für Biofilme wird auch von anderen Forschern verwendet und als ungesättigter Biofilm bezeichnet (Tielen, 2005). Abbildung 6 (b) zeigt einen 6 Tage bebrüteten Koloniebiofilm, der auf 1:10 verdünntem LB-Agar aerob bei 37 °C inkubiert wurde.

Zur Gewinnung der Biomasse der angezüchteten Koloniebiofilme wurden diese in 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,4) resuspendiert und die Trübungen der Kulturen wurden photometrisch bei 578 nm vermessen (siehe Kapitel 1.2). Anschließend erfolgte die Ernte der benötigten Komponenten und die entsprechende Vermessung der Proben.

Um die Lebendzellzahl der im Koloniebiofilm vorhandenen Bakterien zu bestimmen, wurde zusätzlich zur OD Messung eine Bestimmung der Kolonie bildenden Einheiten (KBE) der Proben durchgeführt. In Abbildung 7 ist die Koloniebiofilm-Wachstums-

kurve von *P. aeruginosa* PAO1 in AUM, sowie in 1:10 LB zu sehen. Die $OD_{578\text{ nm}}$ ist vergleichend zur Zellzahl aufgetragen.

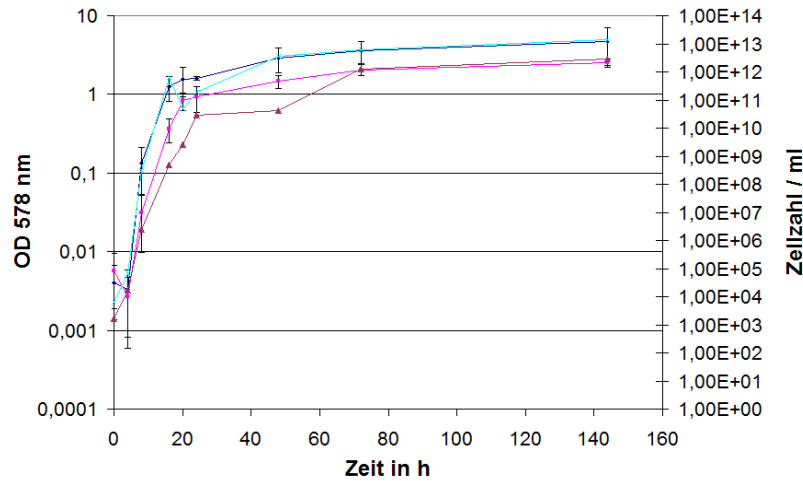


Abbildung 7: Koloniebiofilm-Wachstum von *P. aeruginosa* PAO1. Koloniebiofilme wurden unter aeroben Bedingungen bei 37 °C auf 1:10 LB-Agarplatten (blau) und AUM-Agarplatten (rot) bebrütet. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Optische Dichte bei 578 nm und Lebendzellzahl (KBE/ml) wurden über die Inkubationsdauer von 144 h gegeneinander aufgetragen. Rot: $OD_{578\text{ nm}}$ AUM Koloniebiofilm; blau: $OD_{578\text{ nm}}$ 1:10 LB Koloniebiofilm; rosa: KBE/ml AUM Koloniebiofilm; türkis: KBE/ml 1:10 LB Koloniebiofilm.

Innerhalb der ersten 20 h befanden sich die Bakterien beider Biofilme in der logarithmischen Phase und gingen anschließend in die Stationärphase über. Die geernteten Koloniebiofilm-Suspensionen erreichten nach 6 Tagen bei den AUM-Koloniebiofilmen durchschnittlich eine $OD_{578\text{ nm}}$ von 2,6 und bei 1:10 LB eine $OD_{578\text{ nm}}$ von 4,6 (siehe Abbildung 7).

Das Wachstum von *P. aeruginosa* PAO1 auf AUM und auf 1:10 LB ist im Verlauf sehr ähnlich. Im Gegensatz zu den Wuchsraten in Flüssigkultur, bei denen in AUM höhere Zelldichten erreicht wurden (siehe Abbildung 5), erreichte *P. aeruginosa* PAO1 im Koloniebiofilm auf 1:10 LB-Agarplatten etwas höhere Zellzahlen (etwa $1,43 \cdot 10^{13}$ KBE/ml) als auf AUM-Platten (etwa $2,87 \cdot 10^{12}$ KBE/ml). Die Stationärphase wurde auf beiden Medien erst nach etwa 20 h erreicht, im Gegensatz zu 8 h in Flüssigkultur. Aus Abbildung 7 geht klar hervor, dass die gemessene $OD_{578\text{ nm}}$ der Bakteriensuspension zur Lebendzellzahl (KBE/ml) in Korrelation steht. Auch wenn die Zellzahl des Biofilms auf 1:10 LB-Agarplatten etwa um eine 10er Potenz geringer ausfiel, so war die Tendenz des Wachstums auf AUM und 1:10 LB gleich.

Werden *P. aeruginosa*-Biofilme auf unverdünntem LB-Medium gezüchtet, so werden nach der Ernte maximale Zellzahlen bis zu $1 \cdot 10^{11}$ KBE/ml erreicht (persönliche Mitteilung von S. Thoma). Auf TSA- (*tryptic soy agar*) Platten erreichte *P. aeruginosa* PAO1 bereits nach 8 h Zellzahlen von $1 \cdot 10^9$ KBE/ml (Borriello *et al.*, 2004, Jones *et al.*, 2006). Anhand dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass *P. aeruginosa* in AUM bzw. 1:10 LB eine geringere OD_{578 nm}, aber trotzdem eine erhöhte Lebendzellzahl zeigt, im Gegensatz zu Vollmedien wie LB oder TSA.

3.1.3 Anaerobes Wachstum von *P. aeruginosa* im Koloniebiofilm-Anzuchtsystem

Um die Sauerstoff-limitierten Bedingungen im Harnweg nachzustellen, wurden Wachstumsexperimente von *P. aeruginosa* PAO1 durchgeführt, welche unter anaeroben Bedingungen in Koloniebiofilmen auf Membranfiltern bebrütet wurden. Der Nitratgehalt im Urin eines gesunden Menschen liegt bei etwa 160 mg/l, was einer Molarität von 2,6 mM entspricht. Der Nitratgehalt ist aber, genau wie die anderen Bestandteile des Urins, tageszeit- und diätabhängig (Xia *et al.*, 2003). Für anaerobes Biofilmwachstum von *P. aeruginosa* werden unter Laborbedingungen standardmäßig 50 mM - 100 mM Kaliumnitrat zugesetzt, um einen terminalen Elektronenakzeptor zur Verfügung zu stellen (Borriello *et al.*, 2006, Benkert *et al.*, 2008, Trunk *et al.*, 2010). Daher wurde auch in dieser Arbeit an Stelle der physiologischen Nitratkonzentration 50 mM Kaliumnitrat zugesetzt. Das entspricht einer Nitratkonzentration von 30,7 mM. Gemessen wurde die OD_{578 nm} der Biofilmsuspensionen. Die Koloniebiofilme wurden bis zu 6 d anaerob bei 37 °C auf 1:10 LB-Agarplatten sowie AUM-Agarplatten bebrütet, jeweils mit 50 mM Kaliumnitrat. Die Koloniebiofilme wurden dabei täglich auf frische Agarplatten überführt. Die Mittelwerte aus drei unabhängigen Wachstumsexperimenten sind in Abbildung 8 dargestellt.

Die maximal erreichte OD_{578 nm} von *P. aeruginosa* PAO1 lag bei 5,9 auf 1:10 LB mit 50 mM Kaliumnitrat bzw. 3,9 auf AUM mit 50 mM Kaliumnitrat. In der Wachstumskurve der Koloniebiofilme zeigte sich bei AUM und auch bei 1:10 LB ein verzögerter Austritt aus der logarithmischen Phase gegenüber Wachstum unter aeroben Bedingungen (Kapitel 3.1.2). Die Bakterien traten unter anaeroben Bedingungen erst nach zwei Tagen in die Stationärphase ein, wogegen sie unter aeroben Bedingungen bereits nach 20 h in die Stationärphase eintraten. Das aerobe Wachstum wird von *P.*

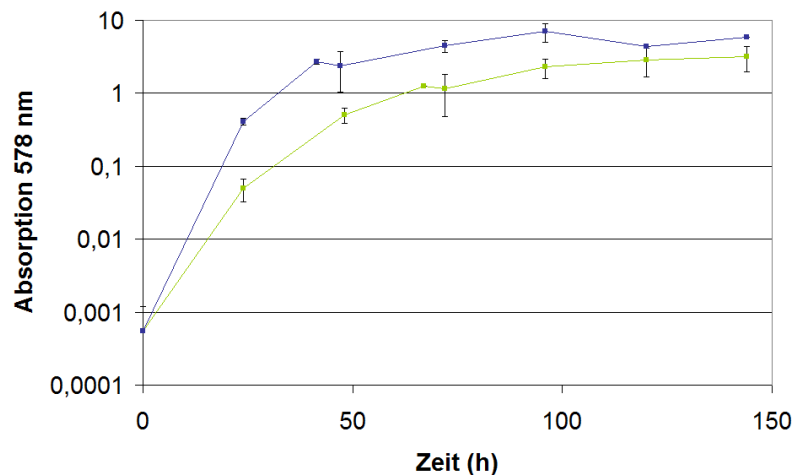


Abbildung 8: Wachstumskurve abgeleitet von anaeroben Wachstumsexperimenten mit *P. aeruginosa* PAO1 Koloniebiofilmen. Mittelwerte der OD_{578 nm} aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, sowie deren Standardabweichungen. Die Bebrütung erfolgte anaerob bei 37 °C für maximal 6 d. Blau: 1:10 LB Koloniebiofilm; grün: AUM Koloniebiofilm.

aeruginosa PAO1 bevorzugt, da hier weitaus höhere Energieausbeuten erreicht werden (Arai *et al.*, 1998, Williams *et al.*, 2007).

3.2 Physiologie von *P. aeruginosa* PAO1 und PA14 unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen

Nachdem die Wachstumsbedingungen unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen in AUM und 1:10 LB untersucht wurden, sollte die Anpassung von *P. aeruginosa* PAO1 an diese Bedingungen betrachtet werden.

3.2.1 Transkriptom von *P. aeruginosa* unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen

Es wurden Transkriptomanalysen mit Hilfe von Affymetrix *Gene Chip*[®] *Pseudomonas aeruginosa* Genome Arrays durchgeführt, für die *P. aeruginosa* PAO1, angezüchtet unter aeroben und anaeroben Bedingungen im Koloniebiofilm, verwendet wurde. Dabei wurde stets AUM als Nährmedium verwendet, wobei Koloniebiofilme, die auf 1:10 LB inkubiert wurden, als Referenz dienten.

3.2.1.1 Isolierung und Integritätsprüfung der gesamtzellulären RNA

Die *P. aeruginosa* PAO1 Koloniebiofilme wurden in der spät-logarithmischen Phase geerntet, aerob nach 20 h, die anaeroben Biofilme nach zwei Tagen. Dabei wurden die Agarplatten für die anaerobe Kultivierung bereits mindestens 24 h vor Verwendung in die Anaerob-Werkbank eingeschleust, um den Sauerstoffgehalt der Platten möglichst gering zu halten. Die Filterbeimpfung ist in Kapitel 2.2.3.1 näher erläutert. Die anaeroben Koloniebiofilme wurden schnellstmöglich noch in der Anaerob-Werkbank abgeerntet und erst zur Zentrifugation im geschlossenen Reaktionsgefäß ausgeschleust. Die nachfolgende RNA Extraktion war für aerobe wie anaerobe Koloniebiofilme gleich und ist in Kapitel 2.4.5 beschrieben.

Es wurden jeweils drei unabhängige Kultivierungen pro Medium und Wachstumsbedingung durchgeführt. Unter aeroben Bedingungen wurden 5 Koloniebiofilme pro Medium und Probe, und unter anaeroben Bedingungen 8 Koloniebiofilme pro Medium und Probe geerntet und vereinigt. Die extrahierte RNA wurde mittels Gelelektrophorese auf ihre Qualität hin untersucht (siehe Kapitel 2.4.6). Hierbei sollten sowohl die 16 S rRNA, als auch die 23 S rRNA als klare Banden erkennbar sein. Für die cDNA Synthese wurden nur RNA Proben verwendet, deren Integrität bei mindestens 8,5 lag. Abbildung 9 zeigt als Beispiel die Qualitätskontrolle einer RNA Probe mittels Bioanalyzer.

Das abgebildete Kontrollgel (Abbildung 9) basiert auf dem Elektropherogramm der Proben. Programmgestützt wird daraus ein virtuelles Gel zur Verdeutlichung erzeugt. In Spur 1 ist der Marker gezeigt. Es folgen die 12 untersuchten Proben. Die 16 S rRNA (nach 40 sec) und die 23 S rRNA (nach 45 sec) sind bei allen Proben als kräftige Banden auf dem Gelbild zu sehen. Degradierete RNA zeigt sich zwischen und unter diesen Banden. Im dazugehörigen Elektropherogramm werden zudem RNA Gehalt der Probe, sowie die Konzentration der RNA angegeben, nebst deren Integrität, wobei vollständig intakte RNA einen Wert von 10 erreicht. Die hier abgebildeten Proben besaßen Integritäten zwischen 9,5 und 9,9. Zusätzlich gibt das Elektropherogramm das Verhältnis zwischen 16 S rRNA und 23 S rRNA an. Dieses liegt bei *P. aeruginosa* optimalerweise etwa bei 1,8-2. Die untersuchten Proben konnten folglich alle verwendet werden.

Es folgte die reverse Transkription zu cDNA (Kapitel 2.4.7). Bei ausreichender Ausbeute (mindestens 70 ng/ μ l) wurde die cDNA fragmentiert, kontrolliert und bei Eignung mit einem Biotinmarker versehen. Das Fragmentierungsmaximum sollte dabei bei

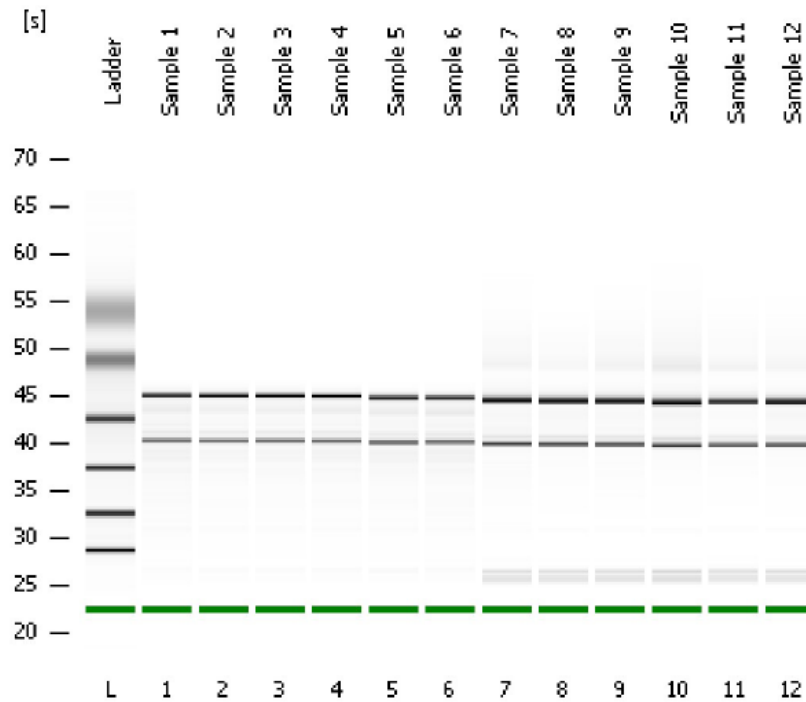


Abbildung 9: RNA Qualitätskontrolle mittels Bioanalyzer, 2100 Expert, Agilent. Virtuelles Kontrollgel, welches auf dem gemessenen Elektropherogramm basierend, erstellt wurde. Das Gel zeigt die aufgetrennten RNA Proben, wobei die beiden großen Banden der 16 S rRNA (nach 40 sec) und der 23 S rRNA (nach 45 sec) entsprechen. Degradierete RNA zeigt sich als undistinkte Banden in den Gelspuren.

etwa 50-200 bp liegen. Nach der Fragmentierung folgte der Markiervorgang (*terminal labeling*), welcher mit einem Neutravidin Shift überprüft wurde. Im Anschluss wurden die cDNA Proben auf *Pseudomonas aeruginosa* GeneChips® (Affymetrix) hybridisiert und vermessen (Kapitel 2.4.8). Dieser Arbeitsschritt erfolgte in der Abteilung *Microbial Pathogenesis* am Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung (HZI) durch Petra Hagendorff.

Nach der Prozessierung der Messdaten durch Maurice Scheer (Institut für Bioinformatik und Biochemie, TU Braunschweig) konnte die Auswertung erfolgen. Abbildung 10 zeigt die Verteilung der Genexpressionsstärken der 12 Arrays, die angefertigt wurden. Er liefert Aussagen über die Qualität der eingesetzten cDNA und über die Vergleichbarkeit von Replikaten.

Wie deutlich zu erkennen ist, wichen die beiden anaeroben Arrays 1:10 LB3 (pink) und AUM3 (türkis) relativ stark von den anderen ab. Diese Abweichungen können beispielsweise durch Degradationen der RNA oder durch schlechte Hybridisierung der

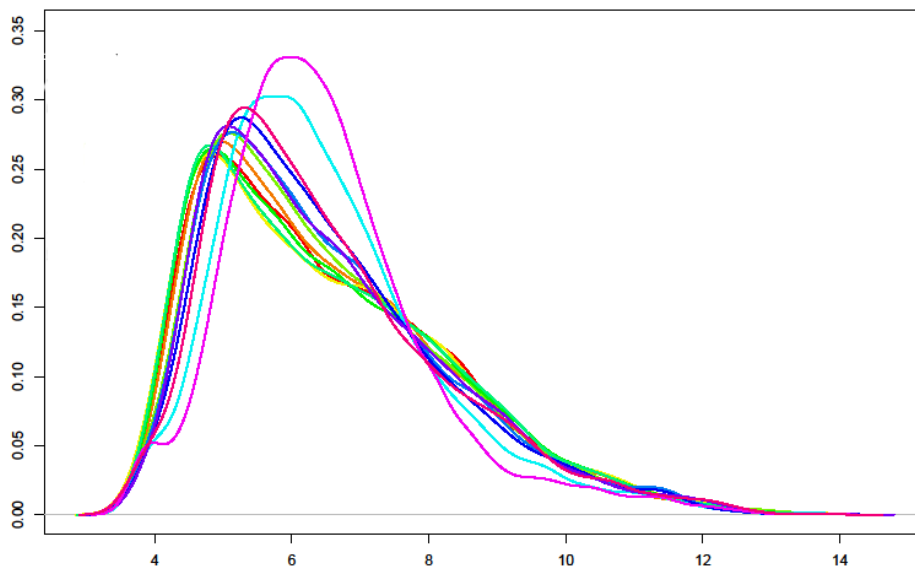


Abbildung 10: Überlagerung der Verteilung der Genexpressionsstärken aller 12 angefertigten Arrays von *P. aeruginosa* unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen. Jede Kurve steht dabei für die Verteilung der Genexpressionsstärke eines Arrays, wobei pro Zustand drei biologische Replika angefertigt wurden. Aerobe Arrays: AUM1: rot; AUM2: orange; AUM3: gelb; 1:10 LB1: hellgrün; 1:10 LB2: dunkelgrün; 1:10 LB3: blaugrün; Anaerobe Arrays: AUM1: türkis; AUM2: blau; AUM3: dunkelblau; 1:10 LB1: lila; 1:10 LB2: violett; 1:10 LB3: pink.

cDNA an die Arrays zustande kommen. Sie wurden daher aus der Auswertung ausgeschlossen, sodass für die anaeroben Proben jeweils zwei Arrays pro Bedingung betrachtet wurden und für die aeroben Proben drei. Alle anderen Arrays wurden nun ihren Gruppen nach gemittelt und die Ergebnisse verglichen.

3.2.1.2 Genexpression von *P. aeruginosa* PAO1 unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen

Eine Zusammenfassung der Auswertung der Transkriptomanalysen ist in den Abbildungen 11 und 12 dargestellt. In den aeroben Koloniebiofilmen wurden 102 Gene vorgefunden, die in AUM im Vergleich zu 1:10 LB differentiell reguliert vorlagen, wobei eine Regulation über 4-fach als Signifikant angesehen wurde. Davon waren 68 Gene in AUM induziert, 34 lagen reprimiert vor. Abbildung 11 zeigt die Anzahl an regulierten Genen eingeteilt in deren funktionelle Gruppen. Eine vollständige Liste aller unterschiedlich regulierten Gene nebst deren Funktion und Regulation ist im Anhang (Tabellen 42 und 43) zu finden.

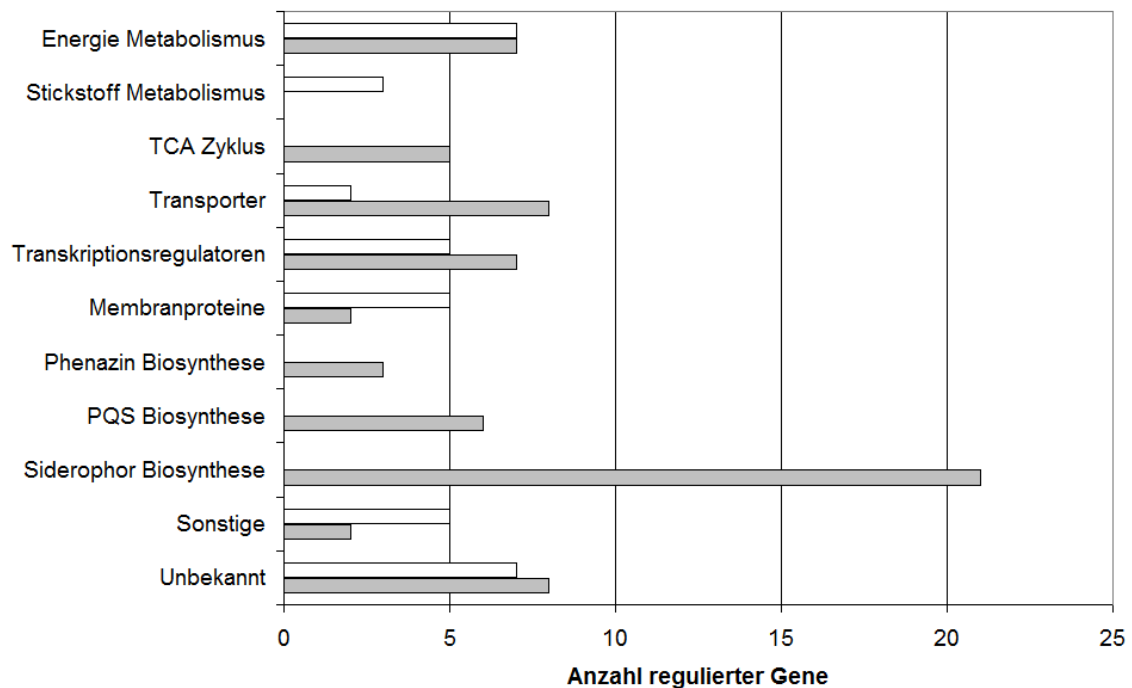


Abbildung 11: Differenziell regulierte Gene von *P. aeruginosa* PAO1 unter aeroben Bedingungen im Koloniebiofilm bis zum Beginn der Stationärphase (20 h), auf AUM oder 1:10 LB gewachsen. Grau: induziert, weiß: reprimiert.

Generell lagen in AUM doppelt so viele Gene induziert vor wie reprimiert. Dies deutet auf eine erhöhte Zellaktivität von *P. aeruginosa* PAO1 in AUM hin. Beim Energie Metabolismus lagen sowohl sieben Gene induziert wie reprimiert vor. Drei Gene des Stickstoff Metabolismus lagen reprimiert vor, der Trikarbonsäure Zyklus (TCA) dagegen war mit fünf Genen des Glyoxylat-Wegs induziert in AUM, was es *P. aeruginosa* PAO1 ermöglicht, mehr Energie in Form von ATP zu gewinnen und zudem Reduktionsäquivalente zu generieren. Auch unter den Genen für Transporter waren acht induzierte, aber nur zwei reprimierte zu finden. Es herrscht folglich unter AUM Wachstumsbedingungen ein höherer Bedarf an Nährstoffen in der Zelle, die über unterschiedliche Transporter eingeschleust werden. Zudem lagen sieben Transkriptionsregulatoren induziert und fünf reprimiert vor. Dies zeigt deutlich die unterschiedliche Regulation in AUM und 1:10 LB. Bei den Membranproteinen waren nur zwei induziert, fünf aber reprimiert. Vier Gene für die Phenazin Biosynthese, sechs Gene der PQS Biosynthese wie auch 21 Gene der Siderophor Biosynthese fanden sich in AUM induziert. Alle drei stehen in Verbindung mit Virulenz und Eisenmangel in *P. aeruginosa* (Ochsner *et al.*, 2002).

Das PQS System gehört zu den Virulenzfaktor regulierenden QS Systemen von *P. aeruginosa*. PQS liegt nur unter aeroben Bedingungen aktiv vor, da die Produktion des Signal-Moleküls Sauerstoff abhängig ist, die Genexpression dagegen ist nicht Sauerstoff abhängig (Diggle *et al.*, 2006, Schertzer *et al.*, 2010).

Unter anaeroben Bedingungen konnten größere Unterschiede festgestellt werden als unter aeroben Bedingungen. Insgesamt waren 310 Gene unterschiedlich exprimiert, davon wurden 161 Gene induziert in AUM vorgefunden, 149 Gene lagen reprimiert vor. Die differentiell reguliert vorgefundenen Gene wurden ihren funktionellen Gruppen zugeordnet. Die Zuordnung ist in Abbildung 12 zusammengefasst.

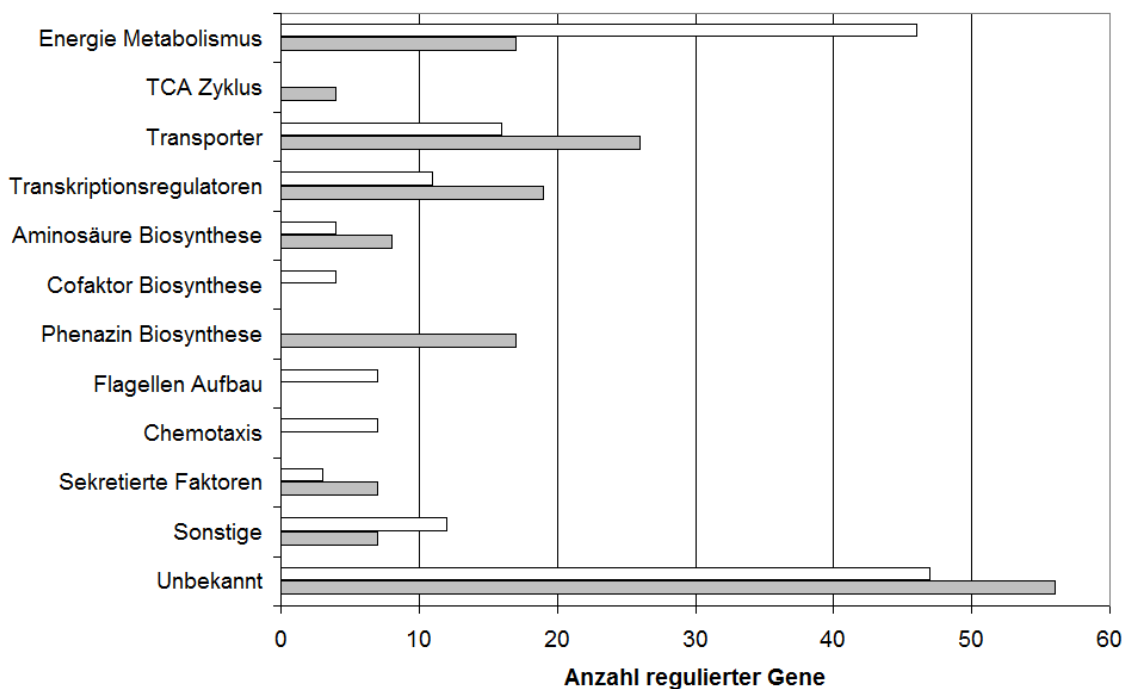


Abbildung 12: Differentiell regulierte Gene von *P. aeruginosa* PAO1 unter anaeroben Bedingungen im Koloniebiofilm bis zum Beginn der Stationärphase (3 d), auf AUM oder 1:10 LB gewachsen. Grau: induziert, weiß: reprimiert.

Es lagen 46 Gene des Energie Metabolismus von *P. aeruginosa* PAO1 unter anaeroben Bedingungen in AUM reprimiert vor, was knapp ein Drittel aller reprimierten Gene ausmacht. Lediglich 17 Gene des Energie Metabolismus waren induziert. Wie auch bereits unter aeroben Bedingungen beobachtet war der Glyoxylat-Weg des TCA Zyklus in AUM induziert, um mehr Energie erzeugen zu können. Bei den Transportern lagen 26 Gene induziert und 16 Gene reprimiert vor, was auch unter anaeroben Bedingungen einen Hinweis auf den Transport von Nährstoffen in die Zelle darstellt.

Unter anaeroben Bedingungen lagen insgesamt 30 Transkriptionsregulatoren differentiell exprimiert vor, von denen 19 induziert und 11 reprimiert waren. Diese hohe Zahl an unterschiedlich exprimierten Regulatoren unter anaeroben Bedingungen weist auch hier auf einen spezifisch angepassten Stoffwechsel von *P. aeruginosa* im Harnweg hin. Zudem waren Gene der Aminosäure Biosynthese wie auch der Phenazin Biosynthese in AUM induziert, die der Cofaktor Biosynthese, des Flagellen Aufbaus und der Chemotaxis dagegen reprimiert. Sieben Gene für sekretierte Faktoren waren in Koloniebiofilmen auf AUM induziert, drei reprimiert.

3.2.1.3 Metabolismus von *P. aeruginosa* unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen

Unter aeroben Bedingungen lagen in aeroben Koloniebiofilmen, die auf AUM inkubiert wurden, die Gene des *nap* Operons *napABC*, die des *cat* Operons *catACB*, die des *ami* Operons *amiRCBE*, sowie die Gene des *ant* Operons *antABC* reprimiert vor.

Tabelle 27: Ergebnisse der Transkriptomanalyse ausgewählter differentiell regulierter Gene beteiligt am Metabolismus von *P. aeruginosa* PAO1 Koloniebiofilmen unter aeroben Bedingungen zu Beginn der Stationärphase, 37 °C, gewachsen auf AUM-Agar oder 1:10 LB-Agar.

PA-Nr.	Gen	Beschreibung	Expression aerob
Energie Metabolismus			
PA2512	<i>antA</i>	Anthranilat Dioxygenase große Untereinheit	0,09
PA2513	<i>antB</i>	Anthranilat Dioxygenase kleine Untereinheit	0,08
PA2514	<i>antC</i>	Anthranilat Dioxygenase Reduktase	0,06
PA2507	<i>catA</i>	Katechol 1,2-Dioxygenase	0,08
PA2509	<i>catB</i>	Mukonat Zykloisomerase I	0,18
PA2508	<i>catC</i>	Muconolacton Delta-Isomerase	0,11
PA1174	<i>napA</i>	Periplasmatische Nitrat Reduktase Protein NapA	0,16
PA1173	<i>napB</i>	Cytochrom c-Typ Protein NapB	0,13
PA1172	<i>napC</i>	Cytochrom c-Typ Protein NapC	0,15
PA3363	<i>amiR</i>	Aliphatischer Amidase Regulator	0,16
PA3364	<i>amiC</i>	Aliphatisches Amidase Expressionsregulator	0,15
PA3365	<i>amiB</i>	Mögliches Chaperon	0,13
PA3366	<i>amiE</i>	Aliphatische Amidase	0,12
TCA Zyklus			
PA4470	<i>fumC1</i>	Fumarat Hydratase	6,13
PA1583	<i>sdhA</i>	Succinat Dehydrogenase, Untereinheit A	0,46
PA1584	<i>sdhB</i>	Succinat Dehydrogenase, Untereinheit B	0,56
PA1581	<i>sdhC</i>	Succinat Dehydrogenase, Untereinheit C	0,51
PA1582	<i>sdhD</i>	Succinat Dehydrogenase, Untereinheit D	0,57
PA1562	<i>acnA</i>	Aconitat Hydratase 1	0,86
PA1787	<i>acnB</i>	Aconitat Hydratase 2	0,41

Das *ami*-Operon wird durch kurzkettige aliphatische Amide induziert (Wilson und Drew, 1995), die im AUM kaum vorhanden sind, und lag in aeroben AUM Koloniebiofilmen von *P. aeruginosa* PAO1, verglichen mit Koloniebiofilmen auf 1:10 LB, reprimiert vor. Der Glyoxylat Weg innerhalb des TCA Zyklus macht es *P. aeruginosa* möglich, kurzkettige Fettsäuren als C-Quelle zum Aufbau von Kohlenhydraten zu nutzen (Brock *et al.*, 2003). Da im AUM keine Zucker zugefügt werden, und auch kaum alternative C-Quellen bereit stehen, ist die Synthese von Kohlenhydraten für *P. aeruginosa* wichtig für die Energiegewinnung. Die Gene des *nap* Operons kodieren für eine periplasmatische Nitratreduktase (Stewart *et al.*, 2002). Unter aeroben Bedingungen lagen die ersten drei Gene des *nap* Operons (*napA*, *napB*, *napC*) reprimiert in AUM Koloniebiofilmen vor. Die Gene *catA*, *catB* und *catC* sind an der Benzoat Degradation beteiligt (Matsumura *et al.*, 2006) und liegen ebenfalls in AUM Koloniebiofilmen reprimiert vor, verglichen mit 1:10 LB Koloniebiofilmen. Der Hefeextrakt, der zum 1:10 LB stärker zugesetzt ist als dem AUM, enthält aromatische Verbindungen, die über das *cat* Operon abgebaut und zu Intermediaten des TCA Zyklus umgesetzt werden können (Kukor *et al.*, 1988).

Unter anaeroben Bedingungen waren wesentlich mehr Unterschiede im Energiemetabolismus von *P. aeruginosa* PAO1 Koloniebiofilmen auf AUM verglichen mit Koloniebiofilmen auf 1:10 LB ersichtlich als unter aeroben Bedingungen. Die Denitrifizierung lag in AUM reprimiert vor, verglichen mit Koloniebiofilmen auf 1:10 LB. So wurden insgesamt 19 Gene aus den Denitrifizierungs-Operons *nir*, *nar*, *nor* und *nos* reprimiert vorgefunden (siehe Tabelle 28). Da unter anaeroben Bedingungen Nitratatmung als bevorzugte Energiegewinnung von *P. aeruginosa* genutzt wird (Zumft, 1997), scheint beim Wachstum auf AUM-Agar eine andere Form der Energiegewinnung bevorzugt zu werden. Aus dem TCA Zyklus lagen die Gene für eine Citrat-Dehydrogenase (*acnA*, *acnB*), sowie für eine Succinat-Dehydrogenase (*sdhB*, *sdhC*) in AUM Koloniebiofilmen reprimiert vor. Allerdings ergab die Traskriptomanalyse einen Hinweis darauf, dass der Glyoxylat Weg innerhalb des TCA Zyklus bevorzugt von *P. aeruginosa* PAO1 in AUM Koloniebiofilmen verwendet wird. Dafür spricht die Induktion des *glc*-Operons, sowie der *acsA*, welche an der Umsetzung von Acetat zu Acetyl-CoA beteiligt ist (Schobert, 1999, Kretzschmar *et al.*, 2010). Das Acetyl-CoA kann dann wiederum in den TCA Zyklus eingeschleust werden. Das Citrat, welches im AUM 2 mM vorliegt, kann von *P. aeruginosa* direkt in den TCA Zyklus eingeschleust und zu ATP und Reduktionsäquivalenten umgesetzt werden. Somit stellt der TCA Zyklus in AUM eine alternative zur Energieversorgung zur Nitratatmung dar.

Tabelle 28: Differentiell exprimierte Gene, beteiligt am Metabolismus von *P. aeruginosa* PAO1 unter anaeroben Harnwegs-ähnlichen Bedingungen, 37 °C, Koloniebiofilme, AUM-Agar oder 1:10 LB-Agar

PA-Nr.	Gen	Beschreibung	Expression anaerob
Denitrifizierung			
PA0517	<i>nirC</i>	Mögl. c-Typ Cytochrom Vorläufer	0,14
PA0515	<i>nirD</i>	Mögl. Transkriptionsregulator	0,17
PA0510	<i>nirE</i>	Mögl. Uroporphyrin-III c-Methyltransferase	0,23
PA0516	<i>nirF</i>	heme d1 Biosynthese Protein NirF	0,20
PA0513	<i>nirG</i>	Mögl. Transkriptionsregulator	0,17
PA0518	<i>nirM</i>	Cytochrom c-551 Vorläufer	0,12
PA0519	<i>nirS</i>	Nitrit Reduktase Vorläufer	0,16
PA0524	<i>norB</i>	Stickoxid Reduktase Untereinheit B	0,09
PA0523	<i>norC</i>	Stickoxid Reduktase Untereinheit C	0,12
PA0525	<i>norD</i>	Mögl. Denitrifikationsprotein NorD	0,18
PA3875	<i>narG</i>	Respiratorische Nitrat Reduktase α Kette	0,15
PA3874	<i>narH</i>	Respiratorische Nitrat Reduktase β Kette	0,13
PA3872	<i>narI</i>	Respiratorische Nitrat Reduktase γ Kette	0,19
PA3873	<i>narJ</i>	Respiratorische Nitrat Reduktase δ Kette	0,21
PA3877	<i>narK1</i>	Nitrit Extrusionsprotein 1	0,23
PA3393	<i>nosD</i>	NosD Protein	0,21
PA3394	<i>nosF</i>	NosF Protein	0,21
PA3391	<i>nosR</i>	Regulatorisches Protein NosR	0,22
PA3392	<i>nosZ</i>	Di-Stickstoff Monoxid Reduktase Vorläufer	0,09
PA1177	<i>napE</i>	Periplasmatische Nitrat Reduktase	4,95
PA4133	<i>ccoN</i>	Cytochrom c Oxidase UE (cbb3-type)	0,10
PA1317	<i>cyoA</i>	Cytochrom o ubiquinol Oxidase UE II	0,05
PA1318	<i>cyoB</i>	Cytochrom o ubiquinol Oxidase UE I	0,09
PA1319	<i>cyoC</i>	Cytochrom o ubiquinol Oxidase UE III	0,13
Fettsäure Metabolismus			
PA3584	<i>glpD</i>	Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenase	0,10
PA0347	<i>glpQ</i>	Phosphodiesterase	0,16
PA1610	<i>fabA</i>	beta-hydroxydecanoyl-ACP Dehydrase	0,20
PA1609	<i>fabB</i>	beta-ketoacyl-ACP Synthase I	0,20
PA2968	<i>fabD</i>	Malonyl-CoA Transacylase	0,10
PA2967	<i>fabG</i>	3-Oxoacyl Reduktase	0,21

3.2.1.4 Physiologie von *P. aeruginosa* unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen

In aeroben *P. aeruginosa* PAO1 Koloniebiofilmen, die auf AUM inkubiert wurden, konnten weder eine verringerte Phosphataufnahme noch verringerte Expression der Gene zum Flagellenaufbau beobachtet werden, verglichen mit Koloniebiofilmen, die auf 1:10 LB bebrütet wurden (siehe Tabelle 29). Diese Gene scheinen nur unter anaeroben Bedingungen benötigt zu werden. Da in AUM lediglich sehr geringe Mengen an Aminosäuren vorhanden sind, waren acht Gene, die am Aminosäuremetabolismus beteiligt sind, induziert. Darunter waren die Gene für die Phenylalanin Biosynthe-

se (*phhB*, *phhC*, *hpd*), eine Asparagin Synthetase (*yucB*), eine Prolin Dehydrogenase (*putA*) sowie eine Urocanase zur Degradation von Histidin (*hutU*).

Tabelle 29: Differentiell exprimierte Gene, beteiligt an der Physiologie von *P. aeruginosa* PAO1 unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen, 37 °C, Koloniebiofilme, AUM-Agar oder 1:10 LB-Agar

PA-Nr.	Gen	Beschreibung	Expression anaerob
Phosphat Aufnahme			
PA5366	<i>pstB</i>	ATP-Bindekomponente ABC Phosphat Transporter	0,04
PA5367	<i>pstA</i>	Membranprotein Komponente ABC Phosphat Transporter	0,04
PA5368	<i>pstC</i>	Membranprotein ABC Phosphat Transporter	0,04
PA5369	<i>pstS</i>	ABC Phosphat Transporter, PstS	0,03
PA3377	<i>phnJ</i>	Konserviertes hypothetisches Protein	0,11
PA3378	<i>phnI</i>	Konserviertes hypothetisches Protein	0,13
PA3379	<i>phnH</i>	Konserviertes hypothetisches Protein	0,18
PA3380	<i>phnG</i>	Konserviertes hypothetisches Protein	0,14
PA3381	<i>phnF</i>	Mögl. Transkriptionsregulator	0,11
PA3382	<i>phnE</i>	Phosphonat Transportprotein PhnE	0,23
PA3383	<i>phnD</i>	Bindeprotein ABC Phosphonat Transporter	0,05
PA3384	<i>phnC</i>	ATP-Bindekomponente ABC Phosphonat Transporter	0,15
PA5360	<i>phoB</i>	Zwei-Komponenten Antwortregulator PhoB	0,03
PA5361	<i>phoR</i>	Zwei-Komponenten Sensor PhoR	0,05
PA5365	<i>phoU</i>	Regulatorisches Phosphataufnahme Protein	0,08
PA3280	<i>oprO</i>	Pyrophosphat-spezifisches Porin	0,01
PA3296	<i>phoA</i>	Alkaline Phosphatase	0,05
PA3319	<i>plcN</i>	Nicht-hämolytische Phospholipase C	0,19
Flagellen Aufbau			
PA1077	<i>flgB</i>	Flagellen Protein FlgB	0,17
PA1078	<i>flgC</i>	Flagellen Protein FlgC	0,22
PA1079	<i>flgD</i>	Flagellen Protein FlgD	0,14
PA1080	<i>flgE</i>	Flagellen Protein FlgE	0,16
PA1081	<i>flgF</i>	Flagellen Protein FlgF	0,16
PA1086	<i>flgK</i>	Flagellen Protein FlgK	0,19
PA1087	<i>flgL</i>	Flagellen Protein FlgL	0,23

14 Gene, die für die Phosphat-Aufnahme und Transport zuständig sind, konnten in anaeroben AUM-Koloniebiofilmen von *P. aeruginosa* PAO1 reprimiert vorgefunden werden, verglichen mit Koloniebiofilmen, die auf 1:10 LB angezogen wurden (siehe Tabelle 29). Im AUM sorgt ein Phosphatpuffer für einen stabilen pH bei 6,5. Phosphat steht den Zellen also in großen Mengen zur Verfügung. Da 1:10 LB keinen Puffer und keine Phosphatsalze enthält, sind Hefeextrakt und Trypton die einzigen P-Quellen, die zur Verfügung stehen. Hier scheint Phosphatmangel zu herrschen, da sowohl der Phosphattransporter *pstBACS*, der Phosphonat Transporter *phnC-J*, das Zwei-Komponenten-System *phoBR* und die Phosphatase *phoA* in 1:10 LB induziert vorlagen. Diese Gene wurden im Zusammenhang mit Phosphatmangel in *P. aeruginosa*

sa und in *E. coli* bereits beschrieben (Wanner, 1992, Filloux *et al.*, 1988, Nikata *et al.*, 1996). Auch *oprO*, ebenfalls an der Phosphataufnahme beteiligt (Siehnel *et al.*, 1992), lag in AUM stark reprimiert vor.

Anorganisches Phosphat induziert Flagellen vermitteltes Schwimmen und Schwärmen bei *P. aeruginosa* PAO1 (Rashid und Kornberg, 2000). Durch die Reprimierung der Phosphat-Transporter wird weniger Phosphat von *P. aeruginosa* PAO1 aufgenommen. Zudem lagen sieben Gene der Flagellen Biosynthese unter anaeroben Bedingungen in *P. aeruginosa* PAO1 Koloniebiofilmen, die auf AUM angezogen wurden, reprimiert vor.

Zellen aus anaeroben AUM Koloniebiofilmen, verglichen mit Koloniebiofilmen auf 1:10 LB, zeigten eine verringerte Expression von sieben Genen aus dem Bereich der Chemotaxis auf, darunter *ptcA* und *ptcB*, die auf L-Aminosäuren reagieren (Kuroda *et al.*, 1995).

3.2.1.5 Regulation der Adaptation von *P. aeruginosa* an Harnwegs-ähnliche Bedingungen

Aus den gesamten Daten wurde ein regulatorisches Netzwerk entwickelt, welches die Einflüsse der unterschiedlich exprimierten Regulatoren darstellt, um so die Veränderungen der Genexpression unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen zu verdeutlichen (Abbildung 13).

Eine wichtige funktionelle Gruppe, der eine große Anzahl Gene (aerob: 6; anaerob: 22) zugeordnet werden konnte, sind die Regulatoren. Sieben Gene, welche für extrazytoplasmatische Sigmafaktoren ($ECF\sigma$) kodieren, wurden unter anaeroben Bedingungen induziert vorgefunden, aerob waren es fünf (siehe Tabelle 30). Sie werden unter anderem durch den Eisenaufnahmeregulator Fur („ferric uptake regulator“) reguliert (Cornelis *et al.*, 2009). Unter Eisenmangelbedingungen ist der Repressor Fur inaktiv. Die $ECF\sigma$ Faktor kodierenden Gene werden transkribiert und können so eine Vielzahl an Genen, oftmals direkt oder indirekt an der Eisenaufnahme beteiligt, regulieren.

Eisenmangel scheint im Harnweg eines der wichtigsten Signale für eine angepasste Genexpression zu sein. Ein wichtiger $ECF\sigma$ Faktor, der an der durch Eisenmangel induzierten Regulation verschiedener Gene beteiligt ist, ist PvdS (Tiburzi *et al.*, 2008). Unter aeroben wie auch anaeroben Bedingungen wurden Gene induziert vorgefunden, die für die Siderophor Produktion benötigt werden und durch PvdS kontrolliert werden. Darunter 13 Gene involviert in Pyoverdine vermittelte Eisenaufnahme wie *fpvA*

Tabelle 30: Differentiell exprimierte Gene von Transkriptionsregulatoren von *P. aeruginosa* PAO1 unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen, 37 °C, Koloniebiofilme, AUM-Agar oder 1:10 LB-Agar

PA-Nr.	Gen	Beschreibung	Expression	
			aerob	anaerob
Transkriptionsregulatoren				
PA1776	<i>sigX</i>	ECF Sigma Faktor SigX		0,23
PA2468	<i>foxI</i>	ECF Sigma Faktor FoxI		4,30
PA0610	<i>prrN</i>	Transkriptionsregulator PrtN		4,09
PA0612	<i>ptrB</i>	Repressor, PtrB		4,05
PA2426	<i>pvdS</i>	Sigma Faktor PvdS	4,02	6,64
PA1003	<i>mvfR</i> , <i>pqsR</i>	Transkriptionsregulator MvfR		6,12
PA4227	<i>pchR</i>	Transkriptionsregulator PchR	3,67	4,48
PA0707	<i>toxR</i> , <i>regA</i>	Transkriptionsregulator ToxR	2,58	7,40
PA0471	<i>fiuR</i>	Transmembransensor		4,20
PA0472	<i>fiuI</i>	ECF Sigma-70 Faktor		4,28
PA4296	<i>pprB</i>	Zwei-Komponenten Antwortregulator		6,87

und *fpvB* (Rezeptor für Ferripyoverdin), *pvdA*, *pvdD*, *pvdE*, *pvdF*, *pvdG*, *pvdH*, *pvdJ*, *pvdN*, *pvdO*, *pvdP*, *pvdQ* und das Gen des Sigmafaktors *pvdS* selbst. Unter anaeroben Bedingungen wurden zusätzlich noch *pvdL*, sowie die Gene *pchB*, *pchE*, *pchF*, *pchG*, *pchH*, *pchI* (Pyochelin-Biosynthese) induziert gefunden.

Über den Urin werden in 24 h etwa 864 µg/l Eisen ausgeschleust (Dlugaszek *et al.*, 2010). Der in der Literatur beschriebene Eisenmangel im Harnweg herrscht auch im Koloniebiofilm Anzuchtssystem vor. Der Eisengehalt in biologischen Flüssigkeiten liegt bei 20 µM und mehr, wobei lediglich 10⁻⁶ µM frei zur Verfügung stehen (Mittal *et al.*, 2008). Auch wenn die Eisenkonzentration im AUM mit 1,8 µM generell keinen Eisenmangel hervorruft (Shand *et al.*, 1985), so ist die Verfügbarkeit jedoch stark begrenzt. Das im AUM befindliche Citrat ist in der Lage, dreiwertiges Eisen aus dem Medium zu komplexieren. Es entsteht Eisen(III)di-Citrat, welches über den Transporter *FecA* (*fecA* anaerob 17-fach induziert in AUM) ins Periplasma aufgenommen wird (Yue *et al.*, 2003, Ramos und Levesque, 2006). Das Citrat wird von *P. aeruginosa* in den TCA Zyklus eingeschleust und zur Energiegewinnung verwendet (Brock *et al.*, 2003). Fünf Gene des TCA Zyklus wurden in AUM induziert vorgefunden. Dreiwertiges Eisen ist für *P. aeruginosa* nicht verwertbar, daher wird das frei gewordene Eisen(III) wahrscheinlich über ABC Transporter vom Periplasma ins Cytoplasma transferiert und dabei zu Eisen(II) reduziert, welches von *P. aeruginosa* verwendet werden kann (Ramos und Levesque, 2006, Cornelis, 2010).

Tabelle 31: Differentiell exprimierte Gene, beteiligt an der Regulation der Eisenaufnahme, sowie von Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa* PAO1 unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen, 37 °C, Koloniebiofilme, AUM-Agar oder 1:10 LB-Agar

PA-Nr.	Gen	Beschreibung	Expression	
			aerob	anaerob
Siderophor Biosynthese und Transport				
PA2386	<i>pvdA</i>	L-Ornithin N5-Oxygenase	4,13	53,52
PA2399	<i>pvdD</i>	Pyoverdin Synthetase D	2,80	7,22
PA2397	<i>pvdE</i>	Pyoverdin Biosynthese Protein PvdE	3,11	14,79
PA2396	<i>pvdF</i>	Pyoverdin Synthetase F	2,61	12,35
PA2425	<i>pvdG</i>	PvdG	3,11	8,95
PA2413	<i>pvdH</i>	PvdH	3,37	33,26
PA2400	<i>pvdJ</i>	PvdJ	3,00	8,11
PA2424	<i>pvdL</i>	PvdL	3,71	13,32
PA2394	<i>pvdN</i>	PvdN	3,43	17,45
PA2395	<i>pvdO</i>	PvdO	2,96	8,83
PA2392	<i>pvdP</i>	PvdP	2,88	12,21
PA2385	<i>pvdQ</i>	PvdQ	2,92	6,69
PA3901	<i>fecA</i>	Fe(III) Dicitrat Transportprotein FecA		17,08
PA2398	<i>fvpA</i>	Ferripyoverdin Rezeptor	2,92	27,64
PA4168	<i>fvpB</i>	Zweiter Ferripyoverdin Rezeptor FvpB	5,04	
PA4230	<i>pchB</i>	Salizylat Biosyntheseprotein PchB		5,18
PA4226	<i>pchE</i>	Dihydroaeruginoiat Synthetase		8,14
PA4225	<i>pchF</i>	Pyochelin Synthetase		8,89
PA4224	<i>pchG</i>	Pyochelin Biosyntheseprotein PchG		7,12
PA4223	<i>pchH</i>	ATP-Bindekomponente ABC Transporter		6,32
PA4222	<i>pchI</i>	ATP-Bindekomponente ABC Transporter		7,24
PA5217		ABC-Eisen-Transporter		4,28
Häm Aufnahme				
PA0672	<i>hemO</i>	Häm Oxygenase		7,36
PA3407	<i>hasAp</i>	Häm Aquisitionsprotein HasAp		63,97
PA3408	<i>hasR</i>	Häm Aufnahme Rezeptor HasR		10,00
PA4708	<i>phuT</i>	Häm Transportprotein, PhuT		5,47
PA4710	<i>phuR</i>	Häm Aufnahme Rezeptor PhuR		5,14
QS kontrollierte Gene				
PA2862	<i>lipA</i>	Lipase		8,83
PA1249	<i>aprA</i>	Alkalische Metalloproteinase		24,69
PA3724	<i>lasB</i>	Elastase LasB		4,77
PQS Biosynthese				
PA0996	<i>pqsA</i>	Mögl. Coenzym A Ligase	2,17	
PA0997	<i>pqsB</i>	PqsB	2,27	
PA0998	<i>pqsC</i>	PqsC	2,33	
PA0999	<i>pqsD</i>	3-Oxoacyl-[acyl-carrier-protein] Synthase III	2,07	
PA1000	<i>pqsE</i>	Quinolon Signal Antwortprotein	2,06	
Phenazin Biosynthese				
PA1001	<i>phnA</i>	Anthranilat Synthase Komponente I	2,40	
PA1002	<i>phnB</i>	Anthranilat Synthase Komponente II	2,14	
PA4217	<i>phzS</i>	Flavin-beinhaltende Monooxygenase	2,52	

Um mehr Eisen in verwendbarer Form verfügbar zu machen, produziert *P. aeruginosa* Pyoverdin und Pyochelin. Diese komplexieren das dreiwertige Eisen im extrazellulären Raum. Ist das Citrat verbraucht, kann Fe(III) aus dem Medium über Pyoverdin und Pyochelin in die Zelle gebracht werden. FpvA bindet das Ferripyoverdin und schleust es ins Periplasma, wo das Eisen freigesetzt wird. Das Pyoverdin wird anschließend wiederverwendet und als Apo-Pyoverdin über eine dreiteilige Effluxpumpe wieder in den extrazellulären Raum ausgeschleust, wo neues Eisen (III) gebunden werden kann (Imperi *et al.*, 2009, Cornelis, 2010).

Zudem wurden unter anaeroben Bedingungen vier Transportergene induziert gefunden, die in die Häm-Aufnahme involviert sind (*hasA*, *hasR*, *phuR*, *phuT*). Häm besitzt ein Eisenmolekül und könnte somit als Eisendonator dienen (Ochsner *et al.*, 2000).

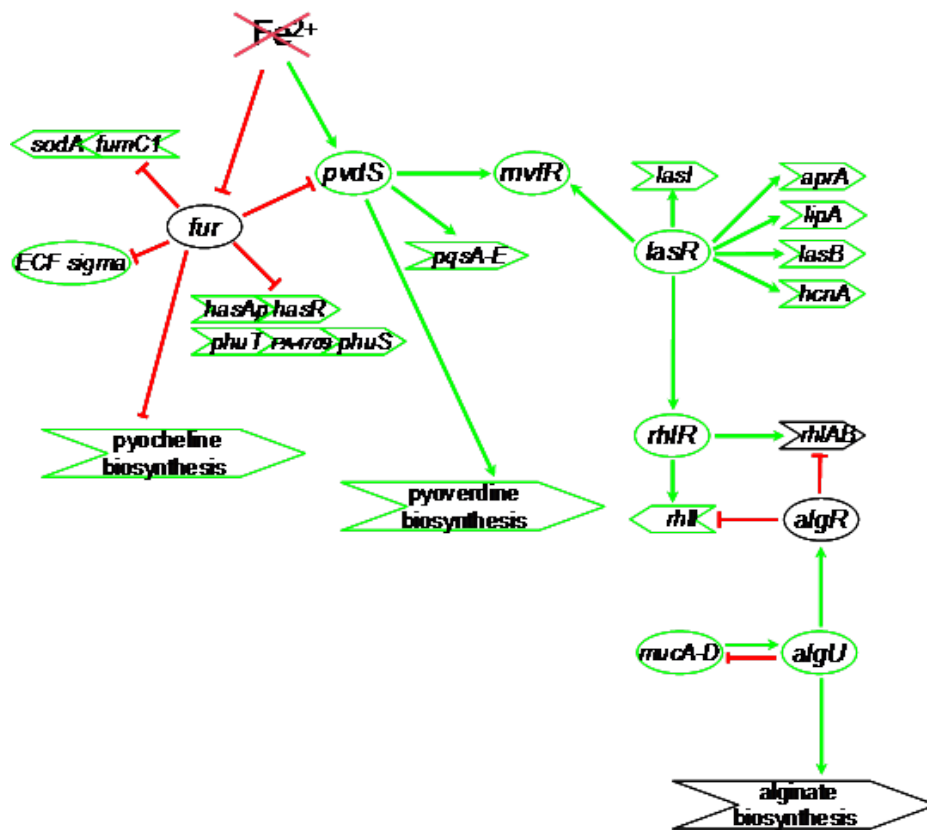


Abbildung 13: Regulatorisches Netzwerk der Eisenverwertung und der Alginatbildung von *P. aeruginosa* unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen im Biofilm. Symbole und Farben: Grün: aktivierende Funktion; rot: hemmende Funktion; Regulatoren: Ellipse; Gene, Operons und Stoffwechselwege: Pfeile. Nicht induzierte Gene/Stoffwechselwege sind schwarz umrahmt, induzierte grün.

PvdS kontrolliert sowohl die Pyoverdin Biosynthese, als auch das PQS Signal und dessen Regulator MvfR. Über die induzierten QS Systeme LasRI und RhIRI in *P.*

aeruginosa AUM Kulturen wird MvfR ebenfalls induziert, sodass die Pyoverdine und PQS Biosynthese weiter erhöht wird. Zusätzlich werden durch die beiden QS Systeme eine große Anzahl an Virulenzfaktoren induziert. Dazu gehören die Gene, welche für extrazelluläre Enzyme wie die Protease *aprA*, die Lipase *lipA* und die Elastase *lasB* kodieren. Für die Expression der Alginate Biosynthese Gene ist der Sigmafaktor *algU* zuständig. Als Gegenspieler zu *algU* dient der anti-Sigmafaktor *mucA*, dessen korrespondierendes Protein MucA AlgU posttranslational reprimiert. Sowohl *algU* als auch *mucA* lagen in Koloniebiofilmen auf AUM zwar reprimiert vor, jedoch unterhalb des gesetzten vierfach Schwellwertes, verglichen mit Koloniebiofilmen auf 1:10 LB. In vorangegangenen Proteomanalysen konnte jedoch gezeigt werden, dass MucA in anaeroben Koloniebiofilmen, die auf AUM inkubiert wurden, induziert vorlag, verglichen mit Koloniebiofilmen auf 1:10 LB (noch unveröffentlicht).

So ist *P. aeruginosa* in der Lage, sich an die spezifischen Bedingungen im Harnweg anzupassen. Dieses auf Basis der Transkriptomdaten aufgestellte regulatorische Netzwerk sollte durch verschiedene biochemische Nachweisreaktionen in *P. aeruginosa* verifiziert werden.

3.2.2 Quorum sensing Aktivität von *P. aeruginosa* unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen

In den Transkriptomanalysen lagen einige Virulenzfaktoren in AUM Koloniebiofilmen, verglichen mit 1:10 LB Koloniebiofilmen, induziert vor. Da die Expression dieser Virulenzfaktoren QS abhängig ist, sollte die QS Aktivität von *P. aeruginosa* PAO1 unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen mit Hilfe von *E. coli* Reporterstämmen untersucht werden. Dazu wurden die Stämme *E. coli* JM109 pSB1075 und JM109 pSB406 verwendet (Tabelle 4). Die Stämme reagieren spezifisch auf die verschiedenen Acyl-Homoserinlactone (AHL) von *P. aeruginosa*. Das AHL des LasRI Systems, 3-oxo-C₁₂-HSL, wird vom *E. coli* JM109 pSB1075 erkannt, das C₄-HSL (RhlRI) von *E. coli* JM109 pSB406. Mit Hilfe des Lux-Operons wird dann Lumineszenz gebildet, die im Varioskan Flash (Thermo Scientific, Waltham, USA) detektiert wurde (Kapitel 2.2.6.2). Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse aus fünf unabhängigen Experimenten.

Für das 3-oxo-C₁₂-HSL des Las-Systems (Abbildung 14 (a)) zeigte sich in *P. aeruginosa* PAO1 die gleiche Lumineszenz Intensität in AUM und 1:10 LB. Für *P. aeruginosa* PA14 dagegen war die relative Lumineszenz in AUM doppelt so hoch wie in 1:10 LB. Bei dem Rhl System (Abbildung 14 (b)) waren die Lumineszenzen von *P. aeruginosa*

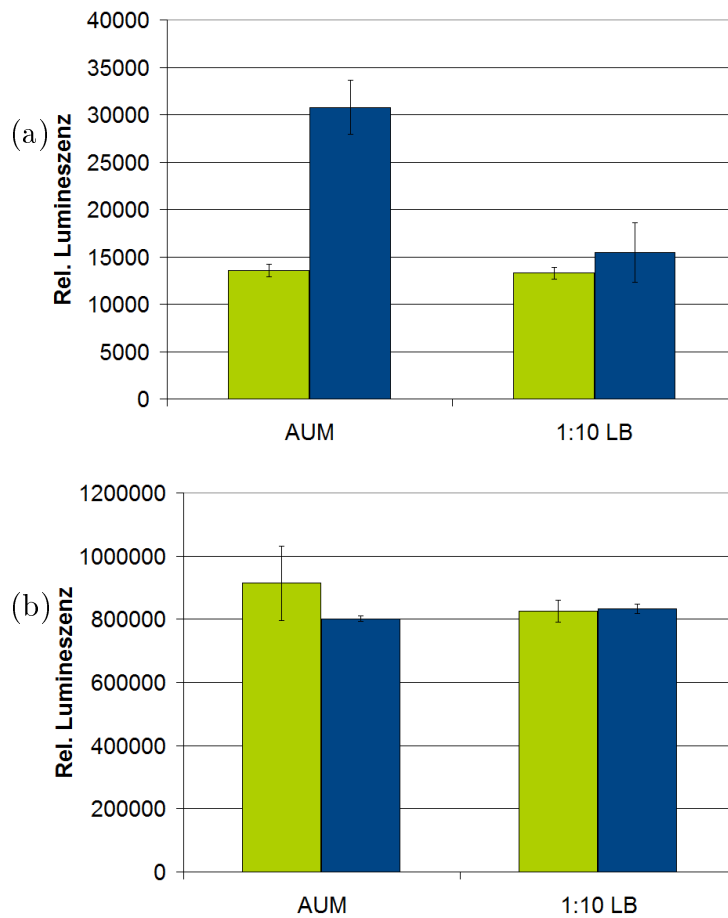


Abbildung 14: Nachweis von QS Molekülen von *P. aeruginosa* über *E. coli* Reporterstämmen. Mittelwerte aus 5 unabhängigen Experimenten. Relative Lumineszenz durch (a) *E. coli* JM109 pSB1075 (3-oxo-C₁₂-HSL), (b) *E. coli* JM109 pSB406 (C₄-HSL). PAO1: grün, PA14: blau.

PAO1 und PA14 in AUM und 1:10 LB nahezu identisch. Zusammenfassend ist die Produktion von QS Molekülen in den *P. aeruginosa* Stämmen PAO1 und PA14 teilweise unterschiedlich.

Es werden von *P. aeruginosa* PAO1 und PA14 scheinbar unterschiedliche QS Systeme zur Reaktion auf die Wachstumsbedingungen in AUM verwendet. Eine unterschiedliche Regulation des Las- und des Rhl-Systems wurde für PAO1 bereits zuvor beschrieben (Duan und Surette, 2007). So sind die Expressionsprofile von *lasR*, *lasI*, *rhlR* und *rhlI* in Minimalmedium (z.B. 1:4 verdünntes LB) stärker als in Vollmedium (LB, Duan und Surette, 2007). Eisenmangel wirkte sich ebenfalls induzierend auf beide Systeme aus, wobei ein stärkerer Effekt für das LasRI System beobachtet wurde (Duan und Surette, 2007). Da das Las-System in *P. aeruginosa* aktivierend auf das

Rhl-System wirkt (Latifi *et al.*, 1996), und die Lumineszenz generell höher war als die des Las-Systems, ist denkbar, dass die geringe Erhöhung der Rhl-Signalmoleküle bei PAO1 in AUM einen sekundären Effekt darstellen, der durch das Las System ausgelöst wurde. Möglicherweise war im Las System der Schwellenwert der Signalmoleküle bereits erreicht, sodass keine weitere Erhöhung stattfand. Bei PA14 war die Verdoppelung der 3-oxo-C₁₂-HSL in AUM, verglichen mit 1:10 LB, der deutlichste Unterschied zwischen den Medien. Bei erhöhter Anzahl von QS-Signalmolekülen wäre zu erwarten, dass die Virulenzfaktoren in *P. aeruginosa* ebenfalls erhöht in AUM vorliegen.

3.2.3 Aktivität extrazellulärer Enzyme

Einige der in der Transkriptomanalyse hochregulierten Gene kodieren für enzymatische Virulenzfaktoren. Sie können über photometrische Enzymaktivitätstests nachgewiesen und quantifiziert werden. Die Durchführung ist in Kapitel 2.3.2 beschrieben. Zellfreie *P. aeruginosa* PAO1 Überstände von AUM beziehungsweise 1:10 LB Stationärphasekulturen wurden für die Quantifizierung der Protease- und Lipase-Aktivität eingesetzt. Die Ergebnisse der Protease Aktivität zeigt Abbildung 15 (a), die der Lipase-Aktivität Abbildung (b).

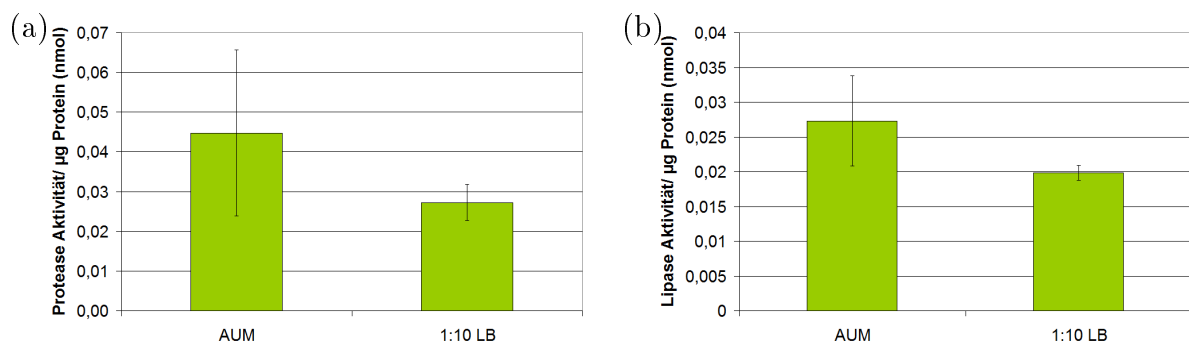


Abbildung 15: (a): Protease und (b): Lipase-Aktivität von *P. aeruginosa* PAO1 in zellfreiem Überstand aus anaeroben, planktonischen Kulturen (24 h, 100 rpm).

In *P. aeruginosa* PAO1 war die Protease-Aktivität unter anaeroben, planktonischen Bedingungen in AUM erhöht gegenüber Kulturen aus 1:10 LB (0,045 zu 0,027 nmol/ μg Protein). Dies bestätigt die Ergebnisse aus den Transkriptomstudien (siehe Kapitel 3.2.1), in denen sich die Genexpression der extrazellulären Proteasen *aprA* und *lasB* in AUM induziert zeigte, verglichen mit der Expression in 1:10 LB.

Auch die Lipase-Aktivität von *P. aeruginosa* PAO1 war in AUM in anaeroben Flüssigkulturen mit 0,027 nmol/ μg Protein erhöht gegenüber der Aktivität in 1:10 LB

Kulturen mit 0,020 nmol/ μ g Protein. Auch hier konnten die Ergebnisse aus den Transkriptomstudien bestätigt werden in denen *lipA* induziert in anaeroben, planktonischen AUM Kulturen vorlag.

3.2.4 Bestimmung von Uronsäuren in *P. aeruginosa* Biofilmen

Die Gene für Enzyme der Alginatproduktion waren im Biofilm unter anaeroben Bedingungen im Transkriptom nicht differentiell reguliert, wenn *P. aeruginosa* PAO1 auf AUM-Agar angezüchtet wurde. Jedoch konnte in vorhergehenden Proteomanalysen in anaeroben AUM Koloniebiofilmen MucA induziert vorgefunden werden, welches die Alginatbiosynthese als Anti-Sigmafaktor reprimiert (Schurr *et al.*, 1996). Zur Überprüfung wurden Koloniebiofilme von *P. aeruginosa* PAO1 anaerob kultiviert (37 °C, siehe Kapitel 2.2.3.1), der Koloniebiofilm wurde abgeerntet und auf seinen Alginatgehalt untersucht (Kapitel 2.3.3). Die Mittelwerte sind in Abbildung 16 gezeigt.

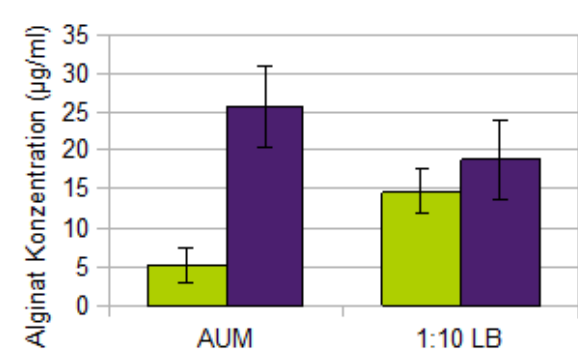


Abbildung 16: Alginat-Konzentration in *P. aeruginosa* PAO1 und PA14 Koloniebiofilmen, gewachsen auf AUM- bzw 1:10 LB-Agarplatten. grün: PAO1, blau: PA14. Mittelwerte und Standardabweichung aus fünf voneinander unabhängigen Untersuchungen.

Unter anaeroben Bedingungen produziert *P. aeruginosa* PAO1 im Biofilm weniger Alginat auf AUM-Agar (5 μ g/ml) als auf 1:10 LB-Agar (15 μ g/ml). *P. aeruginosa* PA14 produzierte dagegen beim Wachstum auf AUM etwas mehr Alginat (25 μ g/ml) als auf 1:10 LB-Agar (19 μ g/ml). Die reprimierte Alginat Produktion von anaeroben *P. aeruginosa* PAO1 Koloniebiofilmen, inkubiert auf AUM-Agar, welche in der Gen-expression der Mikroarrays beobachtet werden konnte, konnte somit bestätigt werden. Die gegensätzliche Tendenz bei PA14 beruht möglicherweise auf den unterschiedlich aktiven QS-Systemen. In PAO1 ist das Rhl-System etwas stärker aktiv als in PA14. Der Regulator der Alginatproduktion AlgR, wirkt im Biofilmwachstum inhibierend auf das

Rhl-System und aktiviert gleichzeitig die Gene für die Alginatsynthese (Gooderham und Hancock, 2009, Morici *et al.*, 2007). Ist AlgR inaktiv, so erhöht sich die Expression des Rhl-Systems und die Alginatproduktion verringert sich. Da in PA14 die Aktivität des Rhl-Systems etwas geringer ist als in PAO1 könnte das der Grund sein für die erhöhte Alginatproduktion in PA14 Koloniebiofilmen auf AUM-Agarplatten.

3.3 Charakterisierung klinischer *P. aeruginosa* Isolate

31 klinische *P. aeruginosa* Isolate aus Harnwegsinfektionen wurden auf ihre phänotypischen Eigenschaften hin untersucht. Ziel dieser Untersuchungen war es, die speziellen Fähigkeiten der *P. aeruginosa* Harnwegs isolate im Vergleich zu den Referenzstämmen *P. aeruginosa* PAO1 und PA14 zu identifizieren. Zu diesem Zweck wurden die Serotypen aller Stämme bestimmt (siehe Kapitel 3.3.1), die Virulenzfaktoren der Stämme wurden untersucht und, soweit möglich, quantifiziert. Dazu gehörte die Einteilung der Stämme nach Vorhandensein von ExoS oder ExoU (Kapitel 3.3.3) und auch ihre Fähigkeit zur Kommunikation untereinander via QS (Kapitel 3.3.2). Zudem wurde das Wachstumsverhalten einiger ausgewählter Isolate in AUM untersucht.

3.3.1 Serotypisierung von klinischen Harnwegs isolaten

Als Gram-negatives Bakterium produziert *P. aeruginosa* ein Lipopolysaccharid (LPS). Es besteht aus der *Core*-Region, dem Lipid A, sowie zwei verschiedenen O-Antigenen. Das B-Band O-Antigen und das A-Band O-Antigen (Rivera und McGroarty, 1989). Für die Serotypisierung der 20 Serogruppen von *P. aeruginosa* ist die sich wiederholende O-Antigen Region des B-Bands von Bedeutung (Liu *et al.*, 1983, Liu und Wang, 1990, Kintz und Goldberg, 2008). Bei Stämmen, denen dieser B-Band O-Antigen Bereich fehlt, spricht man von rauhem LPS, im Gegensatz zu glattem LPS mit B-Band O-Antigen (Hancock *et al.*, 1983, Knirel *et al.*, 2001, Augustin *et al.*, 2007). Stämme mit rauhem LPS wurden bereits in der Literatur als weniger virulent in Tiermodellen beschrieben (Kintz und Goldberg, 2008). Die Durchführung der Serotypisierung mit Hilfe der Antiseren von Biorad ist in Kapitel 2.2.8 beschrieben.

Die *P. aeruginosa* Harnwegs isolate (siehe Kapitel 2.1.3, Tabelle 3), sowie die beiden Referenzstämmen *P. aeruginosa* PAO1 und PA14, wurden zunächst in ihre polyvalente

Gruppe eingeordnet, anschließend erfolgte die Bestimmung des monovalenten Serotyps. Von den 31 untersuchten Isolaten konnten 16 der polyvalenten Gruppe PMA zugeordnet werden. Drei Isolate gehörten der PME an und sechs Isolate reagierten positiv auf das polyvalente PMF Serum. Drei der untersuchten Stämme blieben bei allen Antiseren negativ, drei weitere polyagglutinierten (reagierten mit mindestens drei polyvalenten Seren) und konnten somit keinem Serotyp exakt zugeordnet werden. Die einzelnen Ergebnisse der Serotypisierung sind in Tabelle 32 aufgelistet.

Tabelle 32: Serotypisierung von 31 uropathogenen *P. aeruginosa* Stämmen sowie den Referenzstämmen PAO1 und PA14. Angegeben ist die polyvalente und die monovalente Serogruppe des jeweiligen Stamms.

Stamm	polyvalent	monovalent
MH05	PMA	P1
MH06	PMA	negativ
MH07	PMA	P1
MH08	PMA	P1
MH09	negativ	negativ
RN12	PMA	P6
RN13	PMA	P4
RN14	PMA	P6
MH15	PME	P5
MH16	PMA, PME, PMC, PMF	polyvalent
MH17	PMA	P6
MH18	negativ	negativ
MH19	PMA	P6
MH20	PMF	P8
RN21	PMA	P6
MH25	PMA	P1
MH26	PMA, PME, PMC	negativ
MH27	negativ	negativ
MH28	PME	P5
MH29	PMF	P11
MH30	PMF	P11
MH33	PME	P5
MH34	PMA, PME, PMC	negativ
MH35	PMF	P11
MH36	PMF	P11
MH37	PMA	P6
MH38	PMF	P12
MH39	PMA	P6
MH55	PMA	P6
MH56	PMA	P6
MH57	PMA	P1
PAO1	PME	P5
PA14	PMC	P10

Die vertretenen Serotypen sind heterogen, allerdings konnten 16, also mehr als 50 % der klinischen Harnwegs isolate, der polyvalenten PMA Gruppe zugeordnet werden.

Davon reagierten neun Stämme mit dem P6 Antiserum, fünf waren P1 positiv. Damit bilden P1 und P6 die am häufigsten vertretenen Serotypen unter den Harnwegsisolaten. Bemerkenswerterweise war *P. aeruginosa* PA14 der einzige Stamm, der der polyvalenten Gruppe PMC eindeutig zugeordnet werden konnte. Diese Gruppe fand sich nicht in den untersuchten Isolaten wieder. Weiterhin recht häufig vertreten war der P11 Serotyp aus PMF, welcher viermal vertreten war, sowie der Serotyp P5 (3x) aus der PME Gruppierung. Sie zählen somit zu den vier häufigsten Serogruppen dieser klinischen *P. aeruginosa* Isolate und decken einen Anteil von 71 % ab. Fast 23 % der Stämme konnte nicht ihrem monovalenten Serotyp zugeordnet werden. Ein solches Phänomen ist bereits im Zusammenhang mit klinischen Isolaten aus der Cystische Fibrose Lunge beschrieben worden, wo nicht agglutinierende *P. aeruginosa* Isolate kaum oder gar kein O-Antigen aufwiesen, also ein rauhes LPS besitzen (Hancock *et al.*, 1983). Möglicherweise handelt es sich bei den hier nicht agglutinierenden Harnwegsisolaten ebenfalls um Stämme mit rauhem LPS.

Die restlichen 6 % der Stämme verteilen sich auf zwei weitere Serotypen (P8, P12). In der Literatur wird P11 mit 34 % als die am Häufigsten in Harnwegsinfektionen auftretende Serotyp beschrieben (Mittal *et al.*, 2010). Die zweithäufigste Gruppe mit 22 % war die PME Gruppe (darunter vor allem P2, P5 und P16), dicht gefolgt von P6 (10 %) und P1 (8 %). Diese Häufigkeitsverteilung deckt sich sehr gut mit der in dieser Arbeit beobachteten Verteilung.

3.3.2 Quorum Sensing Aktivität von klinischen *P. aeruginosa* Harnwegsisolaten

Die Produktion und Aktivität von Virulenzfaktoren eines Stammes sind maßgeblich für den Verlauf einer Infektion. Sie entscheiden, ob eine Infektion für das Bakterium erfolgreich verläuft, oder von den Wirtsabwehr-Mechanismen erkannt und bekämpft wird. Als teils dominierender Keim in Harnwegsinfektionen nutzt *P. aeruginosa* Virulenzfaktoren, die es dem Bakterium ermöglichen, die vorhandenen Nährstoffe effizienter zu nutzen. Das Siderophor Pyoverdine dient dabei dem komplexieren von Fe^{3+} (Upritchard *et al.*, 2007) und wirkt so dem häufig auftretenden Eisenmangel im Harnweg entgegen. Um eine weitere potentielle Nahrungsquelle nutzbar zu machen dient die Lyse von Erythrozyten durch das extrazelluläre Enzym Hämolyse (Mittal *et al.*, 2006), wodurch die Inhaltsstoffe freigesetzt werden und so *P. aeruginosa* zur Verfügung stehen.

Tabelle 33: Quorum Sensing-Aktivität der klinischen *P. aeruginosa* Harnwegs isolate. Angegeben ist die QS-Aktivität des Stammes über die indirekte Quantifizierung des 3-oxo-C₁₂-HSL mit Hilfe des Reporterstammes *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4, Fuqua und Winans, 1996). Vermessen wurde der gebildete blaue Hof in mm.

Stamm	QS (mm)		
MH05	8,0	±	0,3
MH06	7,3	±	0,4
MH07	9,3	±	0,4
MH08	8,8	±	0,3
MH09	4,0	±	0,0
RN12	6,8	±	0,3
RN13	9,5	±	0,2
RN14	7,2	±	0,4
MH15	9,3	±	0,5
MH16	8,5	±	0,3
MH17	7,0	±	0,2
MH18	7,5	±	0,4
MH19	5,5	±	0,2
MH20	9,5	±	0,3
RN21	9,0	±	0,3
MH25	10,0	±	0,3
MH26	7,2	±	0,4
MH27	10,3	±	0,3
MH28	8,8	±	0,4
MH29	7,0	±	0,4
MH30	9,3	±	0,5
MH33	9,3	±	0,4
MH34	10,2	±	0,4
MH35	4,7	±	0,4
MH36	4,3	±	0,2
MH37	7,7	±	0,3
MH38	5,0	±	0,2
MH39	9,0	±	0,2
MH56	3,8	±	0,3
MH57	9,8	±	0,4
PAO1	10,2	±	0,3
PA14	8,3	±	0,3
PAO1 Δ <i>rhlR</i>	10,0	±	0,2
PAO1 Δ <i>lasR/rhlR</i>	0,0	±	0,0

Viele der *P. aeruginosa* Virulenzfaktoren sind QS reguliert und wurden bereits während meiner Diplomarbeit quantifiziert. Untersucht wurde hier die Produktion des QS Signalmoleküls des LasRI Systems 3-oxo-C₁₂-HSL (siehe Kapitel 2.2.6, Pearson *et al.*, 1994, Van Delden und Iglewski, 1998). Als Reporterstamm diente *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4, Fuqua und Winans, 1996). Die Ergebnisse sind in Abbildung 33 dargestellt.

Alle untersuchten Stämme waren in der Lage, das 3-oxo-C₁₂-HSL zu bilden, sie besaßen folglich alle zumindest ein funktionsfähiges LasRI QS System. Fünf Stämme (vier Harnwegs isolate und PAO1) zeigten eine überdurchschnittlich hohe Aktivität im Test mit 9,8 bis 10,3 mm. 21 der getesteten Stämme zeigte eine mittlere Aktivität mit 5,6 - 9,7 mm, sechs Stämme eine geringe Aktivität mit 3,8 bis 5,5 mm. Von den vier Harnwegs isolaten mit hoher Aktivität gehörten drei zur Serogruppe P1. Bei den Stämmen mit niedriger QS Aktivität konnte keine dominierende Serogruppe festgestellt werden.

Zusätzlich wurde für den QS Test eine *P. aeruginosa* PAO1 Δ *rhlR* Mutante eingesetzt (Beatson *et al.*, 2002, Schreiber *et al.*, 2006), um die Spezifität des Tests zu überprüfen. Eine PAO1 Δ *lasR/rhlR* Doppelmutante diente als Negativkontrolle (Beatson *et al.*, 2002, Schreiber *et al.*, 2006). *P. aeruginosa* PAO1 Δ *rhlR* zeigte wie erwartet, die gleiche Aktivität wie PAO1. Bei der Doppelmutante PAO1 Δ *lasR/rhlR* (Negativkontrolle) konnte, wie erwartet, keinerlei Aktivität mehr nachgewiesen werden.

3.3.3 Die Exoenzyme ExoS und ExoU

P. aeruginosa Stämme besitzen von den Effektorproteinen des Typ III Sekretionssystems (TTSS) entweder ExoS oder ExoU (Feltman *et al.*, 2001). Die *P. aeruginosa* Harnwegs isolate MH05 bis MH57 (siehe Kapitel 2.1.3, Tabelle 3), sowie die beiden Referenzstämme *P. aeruginosa* PAO1 und PA14 wurden mittels Cytotoxizitätstest (Mosmann, 1983, Hogardt *et al.*, 2007) auf deren Ausstattung bezüglich der beiden TTSS Effektorproteine ExoS bzw. ExoU untersucht. Die Durchführung des Tests ist in Kapitel 2.2.7 beschrieben. Bei einer Makrophagen Überlebensrate von 30 % und weniger besitzen die Bakterien das stärker virulente Effektorprotein ExoU, Überlebensraten über 30 % werden einer ExoS-Aktivität zugeordnet (Hogardt *et al.*, 2007). Die Ergebnisse der Einteilung der Stämme aufgrund der Überlebensrate der Makrophagen ist in Tabelle 34 zusammengefasst. Zusätzlich wurden die Zuordnungen des Cytotoxizitätstests mit der zuvor durchgeführten *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP)-Chip-Typisierung verglichen (Tielen *et al.*, 2010). Dabei handelt es sich um eine genotypische Zuordnung der Stämme, welche von Lutz Wiehlmann durchgeführt wurde (Medizinische Hochschule, Hannover).

Von den 31 getesteten klinischen Isolaten konnte bei 74 % eine ExoS-Aktivität festgestellt werden. 26 % dagegen zeigten eine ExoU-Aktivität. In einer vorangegangenen Studie mit 115 klinischen *P. aeruginosa* Isolaten unterschiedlicher Herkunft (Harnweg,

Tabelle 34: Cytotoxizität und Einteilung der klinischen Isolate nach ExoU- oder ExoS-Aktivität im Vergleich zum genetischen Repertoire der Stämme, ermittelt über SNP-Chip-Typisierung. Mittelwerte und Standardabweichungen der Cytotoxizität aus mindestens drei unabhängigen Untersuchungen. Rot markierte Gene in SNP Chip Analyse zeigten ein abweichendes Ergebnis zum Cytotoxizitätstest.

<i>P. aeruginosa</i>	Exoenzym	Überl. Makrophagen (%)		SNP-Chip
MH05	ExoS	37,9	± 5,2	<i>exoU</i>
MH06	ExoS	71,3	± 5,3	<i>exoS</i>
MH07	ExoS	80,0	± 0,9	<i>exoS</i>
MH08	ExoU	54,3	± 1,6	<i>exoU</i>
MH09	ExoS	58,3	± 9,2	<i>exoU</i>
RN12	ExoS	70,0	± 0,4	<i>exoS</i>
RN13	ExoS	56,1	± 7,2	<i>exoS</i>
RN14	ExoS	45,8	± 7,6	<i>exoS</i>
MH15	ExoS	60,0	± 5,2	<i>exoS</i>
MH16	ExoS	62,7	± 6,3	<i>exoU</i>
MH17	ExoS	60,7	± 4,5	<i>exoS</i>
MH18	ExoS	51,8	± 6,1	<i>exoS</i>
MH19	ExoS	72,2	± 5,6	<i>exoS</i>
MH20	ExoU	9,2	± 7,5	<i>exoU</i>
RN21	ExoS	86,2	± 6,3	<i>exoS</i>
MH25	ExoS	55,6	± 1,2	<i>exoS</i>
MH26	ExoU	10,3	± 2,1	<i>exoU</i>
MH27	ExoS	6,7	± 4,8	<i>exoS</i>
MH28	ExoS	45,3	± 3,0	<i>exoS</i>
MH29	ExoS	86,5	± 0,7	<i>exoU</i>
MH30	ExoU	2,2	± 0,8	<i>exoU</i>
MH33	ExoS	37,6	± 10,0	<i>exoS</i>
MH34	ExoS	36,5	± 0,2	<i>exoS</i>
MH35	ExoU	54,9	± 10,0	<i>exoU</i>
MH36	ExoU	11,4	± 1,8	<i>exoU</i>
MH37	ExoS	49,8	± 1,7	<i>exoS</i>
MH38	ExoS	32,6	± 10,0	<i>exoS</i>
MH39	ExoU	12,9	± 0,1	<i>exoS</i>
MH55	ExoS	52,8	± 3,6	nicht getestet
MH56	ExoS	38,0	± 2,0	nicht getestet
MH57	ExoU	20,4	± 3,1	nicht getestet
PAO1	ExoS	34,3	± 8,9	<i>exoS</i>
PA14	ExoU	1,5	± 1,2	<i>exoU</i>

CF-Lunge, Blut, Wunden) zeigte sich über Southern-Blot-Analysen ein Verhältnis von 72 % *exoS* Stämmen zu 28 % *exoU* Stämmen (Feltman *et al.*, 2001). Lediglich eins der 115 klinischen Isolate, die von Feltman (2001) untersucht wurden, besaß sowohl *exoS* als auch *exoU*, bei einem weiteren konnten beide nicht nachgewiesen werden.

Insgesamt 5 der 31 getesteten Isolate zeigten im Cytotoxizitätstest ein abweichendes Ergebnis zur SNP-Chip Typisierung (siehe Tabelle 32, rot markiert). Möglicherweise wird der Cytotoxizitätstest noch von weiteren Faktoren beeinflusst, die hier nicht

speziell untersucht wurden. Vorstellbar wäre ein Einfluss der beiden weiteren Exoenzyme ExoT und ExoY. ExoT besitzt eine 75 %ige Identität in den Aminosäuren im Vergleich zu ExoS. Beide fungieren als GTPase aktivierendes Protein (GAP) und als ADP-Ribosyltransferase (Knight *et al.*, 1995, Goehring *et al.*, 1999, Krall *et al.*, 2000, Kazmierczak und Engel, 2002). Dies könnte zu einem abweichenden Ergebnis geführt haben. Ebenfalls möglich ist eine Mutation im *exoU* Gen, welche die Cytotoxizität herabgesetzt hat, sodass eine höhere Überlebensrate von Makrophagen erreicht wurde.

3.3.4 Cytotoxizitätstest unter infektionsrelevanten Bedingungen

Für den Cytotoxizitätstest nach Hogardt *et al.* (2007) werden die *P. aeruginosa* Stämme üblicherweise in Vollmedium angezogen. Um einen möglichen Medieneinfluss zu testen, wurden die *P. aeruginosa* Stämme PAO1 und PA14 diesmal in AUM und 1:10 LB angezogen. Die Hauptkulturen in AUM und 1:10 LB wurden 4 h inkubiert, die Hauptkultur in LB 2 h, um die gleiche Wachstumsphase zu erreichen, bevor sie zur Infektion auf die J774-Makrophagen gegeben wurden. Die OD_{578 nm} lag bei den Hauptkulturen zum Erntezeitpunkt zwischen 0,8 und 0,9.

Abbildung (a) zeigt die Überlebensrate der Makrophagen nach dreistündiger Infektion mit *P. aeruginosa* PAO1 (Abbildung (b), PA14) gewachsen bis zur exponentiellen Phase in AUM, 1:10 LB und LB. Es wird deutlich, dass *P. aeruginosa* PAO1 und PA14, angezogen in AUM bzw 1:10 LB Medium, kaum oder gar keine Cytotoxizität besitzen. Die Überlebensrate der Makrophagen lag bei 97-98 %. Die Makrophagen aus Infektionen mit in LB angezogenen *P. aeruginosa* zeigten dagegen ihre gewohnten Überlebensraten, bei PAO1 34 % und bei PA14 17 %. Für die fehlende Aktivität der Effektorproteine des TTSS ExoU und ExoS in *P. aeruginosa* AUM und 1:10 LB Kulturen sind mehrere Erklärungen möglich.

P. aeruginosa induziert bei Kupfermangel die Bildung des *Pseudomonas* Typ III Repressors A (*ptrA*), welcher das TTSS inhibiert (Ha *et al.*, 2004). *ptrB* ist ebenfalls ein Repressor des TTSS, welcher bei DNA Schäden aktiviert wird und *ptrN* inhibiert (Wu und Jin, 2005). Sowohl *ptrB* als auch *ptrN* lagen in den Transkriptom Untersuchungen der Koloniebiofilme auf aeroben wie anaeroben AUM Agarplatten induziert vor, verglichen mit Koloniebiofilmen auf 1:10 LB, und werden von *ptrR* inhibiert. *ptrR* lag leicht (1,6-fach) induziert vor. Möglicherweise ist dieser Effekt in LB noch stärker als in 1:10 LB, was beispielsweise mittels qPCR überprüft werden könnte.

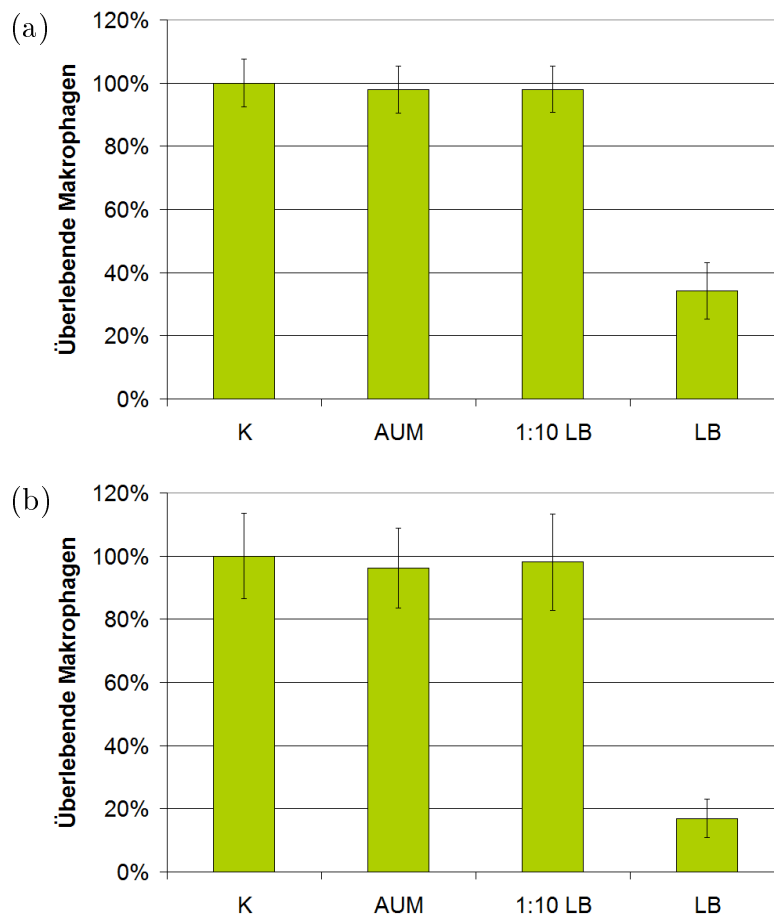


Abbildung 17: Cytotoxizität von *P. aeruginosa* in AUM, 1:10 LB und LB. Test mit planktonischen *P. aeruginosa* (a) PAO1 und (b) PA14 Hauptkulturen. Die Makrophagen (J774) wurden jeweils 3 h bei 37 °C mit *P. aeruginosa* infiziert. K: Uninfizierte Kontrollmakrophagen. Mittelwerte und Standardabweichungen überlebender Makrophagen (J774) aus drei unabhängigen Untersuchungen.

In planktonischen AUM-Kulturen von *P. aeruginosa* konnten wir im Vergleich zu LB Kulturen im Metabolom einen starken Anstieg des Adenosin Monophosphats (AMP) feststellen, welches ein Zeichen für Energiemangel der Zelle ist (Daten unveröffentlicht). Möglicherweise benötigt *P. aeruginosa* PAO1 beim Wachstum in AUM und 1:10 LB so viel Energie zur Synthese von Aminosäuren, dass nicht genug Energie für das TTSS bleibt. Zusätzlich wird das TTSS in *P. aeruginosa* PAO1 vom QS negativ reguliert (Bleves *et al.*, 2005). Beim Wachstum von *P. aeruginosa* in LB, AUM und 1:10 LB sind diese Systeme unterschiedlich aktiv (siehe Kapitel 3.2.2, Albus *et al.*, 1997, Withers *et al.*, 2001). Da das QS stärker bei Nährstoffmangel induziert wird, könnte in LB eine geringere Inhibition stattfinden als in AUM und 1:10 LB (Withers *et al.*, 2001). Zudem wurde ein Einfluss des PQS Systems auf die Expression der Effektorgene

des TTSS festgestellt (Singh *et al.*, 2010), welches in AUM stärker exprimiert wird als in 1:10 LB. Um hier auch den Vergleich zwischen LB, 1:10 LB und AUM ziehen zu können, wäre eine Quantifizierung des PQS Signalmoleküls mittels Dünnschichtchromatographie sinnvoll. Neueste Studien mit 100 *P. aeruginosa* Isolaten zeigten, dass die Cytotoxizität von *P. aeruginosa* ebenfalls von der elastolytischen Aktivität der Stämme, sowie von deren Fähigkeit zur Invasion beeinflusst werden kann (Stepinska *et al.*, 2010).

3.3.5 Wachstumsverhalten klinischer Isolate

Die Untersuchungen des Wachstumsverhaltens waren grundlegend, um den genauen Zeitpunkt des Erreichens der exponentiellen sowie der stationären Wachstumsphase zu ermitteln. Beispielhaft sind in Abbildung 18 aerobe Wachstumskurven von vier klinischen *P. aeruginosa* Harnwegsisolaten und *P. aeruginosa* PAO1 in AUM gezeigt.

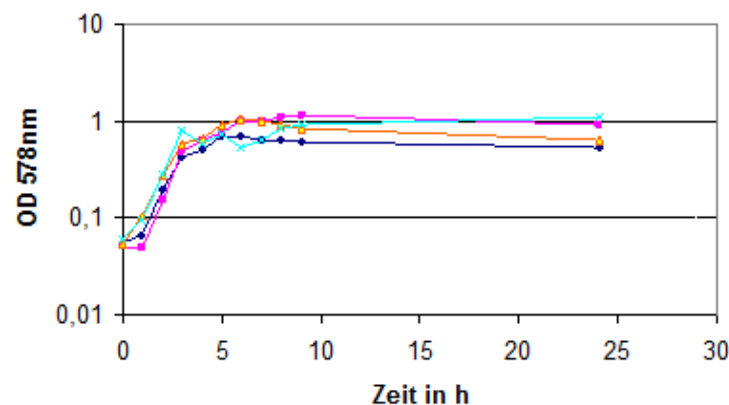


Abbildung 18: Wachstumskurven von vier klinischen *P. aeruginosa* Isolaten und PAO1. Die Stämme wurden 24 h in AUM angezogen (aerob, 37 °C, 200 rpm). Türkis: MH16; rosa: MH19; gelb: RN21; rot: PAO1; blau: MH26.

Da das Wachstumsverhalten der klinischen Isolate genau dem der Referenzstämmen entsprach (siehe Kapitel 3.1.1), konnten keine Anpassungen der Harnwegs isolate allein aufgrund des Wachstumsverhaltens an die spezifischen Bedingungen im AUM beobachtet werden. Da keiner der vier untersuchten klinischen *P. aeruginosa* Harnwegs isolate ein abweichendes Wachstumsverhalten gegenüber den Referenzstämmen aufwies, konnten für die weitere Charakterisierung die selben Erntezeitpunkte verwendet werden wie für die Referenzstämmen *P. aeruginosa* PAO1 und PA14.

3.4 Sequenzierung der Genome von zwei klinischen *P. aeruginosa* Harnwegsisolaten

Da anhand der phänotypischen Charakterisierung der 31 klinischen *P. aeruginosa* Harnwegsisolat nicht final geklärt werden konnte, welche Faktoren bei der Infektion die entscheidende Rolle spielen, sollten zwei der besonders interessanten Stämme sequenziert werden. Ausgewählt wurden die *P. aeruginosa* Isolate MH27 und MH38. Beide Stämme wurden aus Katheter-assoziierten Harnwegsinfektionen (CAUTI) isoliert, wobei der MH27 aus einer chronischen, und der MH38 aus einer akuten Infektion stammte. Die detaillierte Charakterisierung der beiden *P. aeruginosa* Harnwegsisolat ist in Tielen *et al.*, 2010 beschrieben. Eine Gegenüberstellung ist in Tabelle 35 gegeben.

P. aeruginosa MH27 gehört zu der Serogruppe P11, welche in Harnwegsinfektionen mit 34 % am Häufigsten vertreten ist (Mittal *et al.*, 2010). Er zeichnete sich während der Charakterisierung durch die höchste Antibiotikateranz aller untersuchten Stämme aus. Zudem scheint der Stamm hyperpilisiert zu sein, da er keinerlei Bewegung mehr ausführen kann und eine *small colony* Variante (SCV) aufweist. Ein Zusammenhang zwischen SCVs und Hyperpilierung wurde bereits in der Literatur beschrieben, auch wenn einige SCVs noch zur Twitching Motility fähig sind (Déziel *et al.*, 2001, Häussler *et al.*, 2003, Von Götz *et al.*, 2004).

Die QS Aktivität ist dagegen sehr hoch, auch die QS regulierten extrazellulären Enzyme Protease, Elastase, Phospholipase und Hämolyisin waren allesamt aktiv. *P. aeruginosa* MH27 produziert das ExoU Protein und ist stark cytotoxisch. Die Biofilmproduktion entspricht dem Durchschnitt der getesteten Stämme, wobei der Alginategehalt eher gering ist.

Das zweite CAUTI Isolat, welches sequenziert wurde, ist *P. aeruginosa* MH38 und unterscheidet sich stark von *P. aeruginosa* MH27. So gehört er in die Serogruppe P12, die eher selten ist (Mittal *et al.*, 2010), produziert nur eine geringe Menge an Pyoverdine, und ist auch sonst ein eher durchschnittliches Isolat, mit mittleren Mengen an QS Molekülen und mittlerer Biofilmbildung. Er besitzt das ExoS Protein und eine Reihe extrazellulärer Enzyme (siehe Tabelle 35). Interessanterweise zeigte MH38 einen besonders schleimigen Phänotyp, der nicht ausschließlich auf die Alginateproduktion zurück zu führen war. Hier werden möglicherweise weitere extrazelluläre Polysaccharide produziert. Solche extrazellulären Polysaccharide wurden für *P. aeruginosa* bereits beschrieben. Das Pellicula produzierende (*pel*) Operon, sowie das Polysaccharid Synthese Locus Operon (*psl*) spielen neben Alginate eine wichtige Rolle in der Biofilm-

produktion (Friedman und Kolter, 2004b, Friedman und Kolter, 2004a, Ryder *et al.*, 2007).

Tabelle 35: Charakterisierung der beiden sequenzierten *P. aeruginosa* CAUTI Isolate MH27 und MH38 im Vergleich. Daten aus Tielen *et al.*, 2010.

Eigenschaft	MH27	MH38
Serogruppe	P11	P12
Hydrophobizität	mittel	niedrig
Schwimmen	negativ	positiv
Schwärmen	negativ	negativ
Twitching motility	negativ	negativ
Produktion von:		
Alginat	niedrig	hoch
Pyocyanin	mittel	niedrig
Pyoverdin	hoch	niedrig
QS	hoch	mittel
Biofilm	mittel	mittel
Protease	positiv	negativ
Elastase	positiv	negativ
Phospholipase	positiv	positiv
Hämolysin	positiv	positiv
ExoS/U	ExoU	ExoS

Für die Sequenzierung wurde hochmolekulare genomische DNA der beiden Isolate benötigt. Die Präparation ist in Kapitel 2.4.12 beschrieben. DNA beider Stämme wurde isoliert und mittels Quant-ItTM PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Invitrogen, Paisley (UK)) fluorimetrisch vermessen. Quantifiziert wurde mit Hilfe einer Kalibrierreihe (siehe Abbildung 4).

Für eine erfolgreiche Sequenzierung nach dem 3K *Titanium Paired End* Verfahren, nebst Fosmidbank Erstellung, wurden je 200 ng/ μ l dsDNA benötigt. Bei *P. aeruginosa* MH27 konnten 1216 ng/ μ l isoliert werden, bei *P. aeruginosa* MH38 waren es 807 ng/ μ l.

In der DNA durften keinerlei Partikel vorhanden sein, es mussten mindestens 5 μ g dsDNA, die Fragmente nicht kleiner als 20 kb, vorhanden sein. Die Reinheit der DNA sollte bei OD_{260/280nm} bei etwa 1,8 liegen und EDTA frei in Wasser oder 10 mM Tris-HCl (pH 7,5-8,5) gelöst sein. Mittels Nanodrop wurde dann die Reinheit der DNA ermittelt. Sie lag bei 1,83 (MH27) und 1,79 (MH38). Zur Qualitätsüberprüfung wurde die DNA gelelektrophoretisch untersucht.

Die isolierte DNA wurde zu Herrn Dr. Frank-Jörg Vorhölter nach Bielefeld ans Ce-bitec geschickt und sequenziert. Beim 3K *Titanium Paired End* Sequenzierverfahren werden pro Leseinheit (*read*) etwa 400 Basen erfasst. Aus diesen Leseinheiten werden die überlappenden Sequenzen zu sogenannten *Contigs* zusammengesetzt, welche dann bei Überlappung *Scaffolds* bilden. Sie stellen Genomabschnitte dar, die homolog zu Abschnitten aus anderen Sequenzierungen der Gattung sind. Die klinischen Isolate besitzen etwa 200 kleine Lücken im Genom (*gaps*). Es handelt sich um kleine Genomabschnitte von bis zu 200 bp, die mit bis zu 80 % äußerst GC-reich sind. Sie enthalten zudem noch repetitive Sequenzen und konnten daher nicht eindeutig einer Position im Genom zugeordnet werden. Die Eckdaten der Sequenzierung der beiden klinischen *P. aeruginosa* Harnwegs isolate sind vergleichend in Tabelle 36 dargestellt.

Tabelle 36: Sequenzierungsergebnisse der *P. aeruginosa* CAUTI Isolate MH27 und MH38

Eigenschaft	MH27	MH38
Genomgröße	ca 7,12 Mb	ca. 6,90 Mb
GC-Gehalt	65,93 %	65,88 %
Anzahl <i>Contigs</i>	169	258
Anzahl <i>Scaffolds</i>	23	6

Das Genom von *P. aeruginosa* PAO1 besitzt eine Größe von 6,26 Mb mit einem GC-Gehalt von 66,6 % (Stover *et al.*, 2000, Winsor *et al.*, 2009). Die Genome beider *P. aeruginosa* CAUTI Isolate waren größer als das des Referenzstammes *P. aeruginosa* PAO1. Die Genomsequenzierung der beiden klinischen CAUTI Isolate ergab für MH27 eine Genomgröße von etwa 7,2 Mb und für MH38 eine Genomgröße von 6,9 Mb, wobei beide Genome einen GC-Gehalt von 65,9 % aufwiesen (siehe Tabelle 36).

Die Genomsequenzen der *P. aeruginosa* CAUTI Isolate MH27 und MH38 wurden von Dr. Boyke Bunk in unserem Labor einer Kollinearitätsprüfung (Mauve: Genome Alignment Software, Genomecenter of Whisconsin, USA; Darling *et al.*, 2004) unterzogen. Als Referenz diente *P. aeruginosa* PAO1, zudem wurden die Genomsequenzen von *P. aeruginosa* PA14, PA7 und LESB58 in den Vergleich einbezogen. Die Ergebnisse der Kollinearitätsprüfung der Genomsequenzen sind in Abbildung 19 dargestellt.

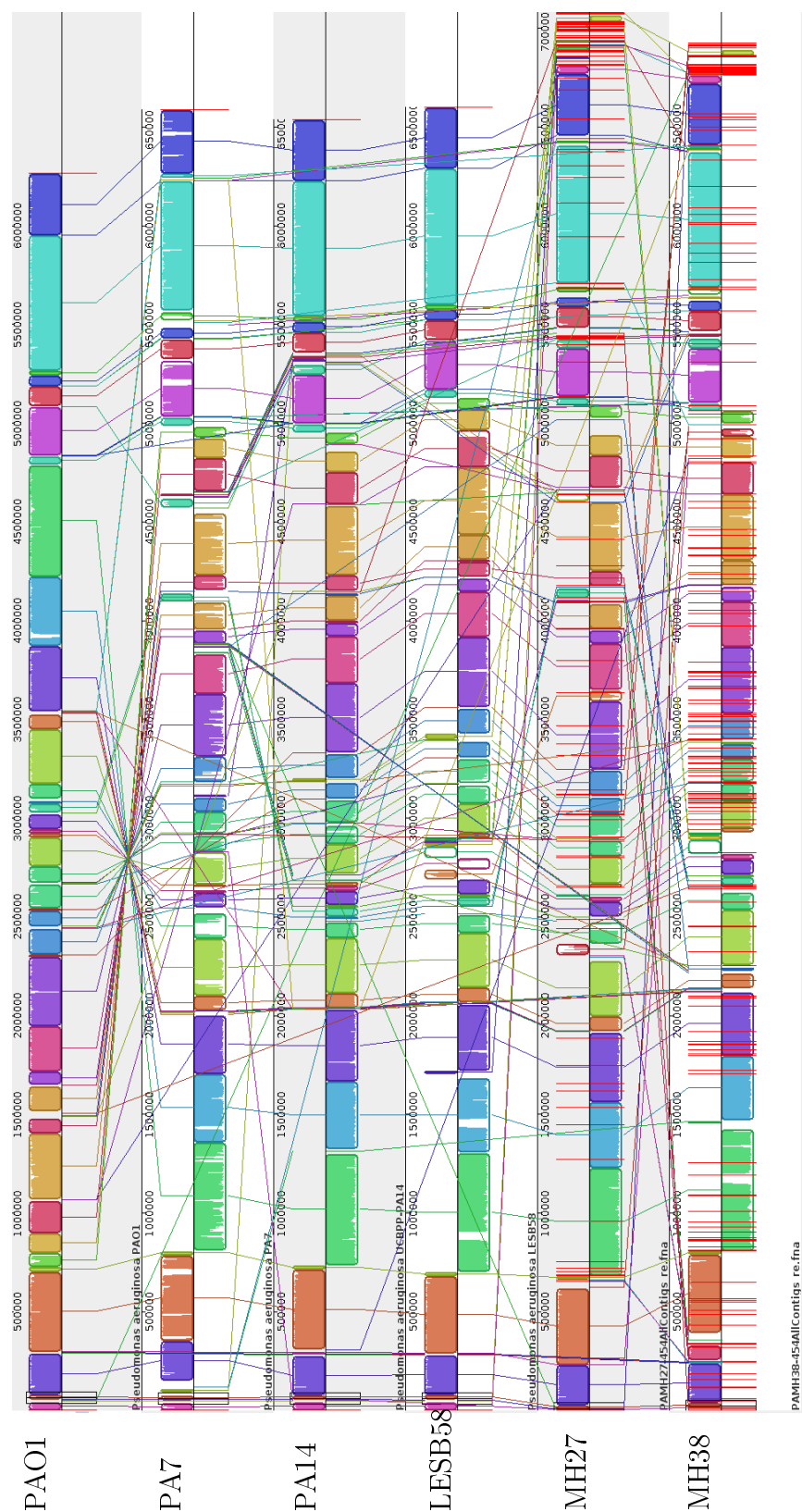


Abbildung 19: Kollinearitätsprüfung von zwei *P. aeruginosa* CAUTI Isolaten gegen Referenzstämme. Vergleich der vollständigen Genomsequenzen von *P. aeruginosa* PAO1, PA14, PA7, LSB58, MH27, MH38. Verbundene *Scaffolds* gleicher Farbe zeigen Homologien zwischen den Stämmen.

Die farbigen Abschnitte (*Scaffolds*) zeigen Homologe Bereiche zwischen den Stämmen. Sie sind mit Linien verbunden um die Lokalisation zwischen den Stämmen vergleichen zu können. Die Anzahl an *Scaffolds* gibt zudem die Anzahl der Lücken im Genom an, da ein geschlossenes Genom aus einem einzigen *Scaffold* besteht. Beide CAUTI Isolate zeigten eine wesentliche höhere Homologie zum *P. aeruginosa* PA14 Genom als zum PAO1 Genom, da bei *P. aeruginosa* PAO1 scheinbar ein großer Bereich des Genoms eine umgekehrte Orientierung, im Vergleich zu den anderen fünf Stämmen, aufweist.

Auffällig ist der Einschluss mehrerer etwa 50 kb großer Fragmente (weiße Bereiche), zu denen keine Homologie in den verglichenen Stämmen gefunden wurde. Um genauere Aussagen über die Genome treffen zu können, müssen weitere Analysen erfolgen, wie die Annotation sogenannter *Singletons* (Wiehlmann *et al.*, 2007). Dabei handelt es sich um zusätzlich vorhandene Gene in neu sequenzierten Stämmen, die nicht bei allen *P. aeruginosa* Stämmen vorkommen, folglich nicht zum *Core*-Genom gehören. Sie erweitern das Pan-Genom von *P. aeruginosa*. Über die Analyse der *Singletons* erhält man Aufschluss über stammspezifische Eigenschaften eines Isolats, die einen Vorteil bei der Etablierung einer Harnwegsinfektion bieten können.

3.5 Funktionsbestimmung des Transkriptions-regulators SlyA aus *P. aeruginosa*

Der Transkriptionsregulator SlyA gehört zur MarR Familie und ist homolog zu RovA aus *Y. pseudotuberculosis* und SlyA aus *E. coli*. Von Sabrina Thomas konnte in vorangehenden Untersuchungen bereits sowohl eine temperaturabhängige als auch Wachstumsphasen abhängige Expression des *slyA* Gens gezeigt werden (Daten unveröffentlicht). Mittels einer *slyA* Überexpressionsmutante sollte nun diese Temperaturabhängigkeit genauer untersucht werden. Zudem sollten mit Hilfe von Transkriptomanalysen die Zielgene des Regulators SlyA identifiziert werden. Für diese Untersuchungen wurden vergleichende Analysen mit *P. aeruginosa* PAO1, PA14 sowie den Überexpressionsstämmen PAO1 Δ *slyA* und PA14 Δ *slyA* (siehe Tabelle 3) durchgeführt.

3.5.1 Genexpression von *slyA*

Um die exprimierte Menge an *slyA* Transkript zu ermitteln, wurde die Genexpression sowohl in *P. aeruginosa* PAO1 und PA14, als auch in den *slyA* Überexpressionsstämmen PAO1 Δ *slyA* und PA14 Δ *slyA*, mittels qPCR überprüft. Dazu wurden LB Flüssigkulturen wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben angeimpft und bei 37 °C für 2 h bzw. bei 25 °C für 4 h schüttelnd (200 rpm) bis zur logarithmischen Phase inkubiert. Die *P. aeruginosa* Zellen wurden abzentrifugiert, die RNA isoliert (siehe Kapitel 2.4.5) und zu cDNA umgeschrieben (Kapitel 2.4.7). Die Durchführung der qPCR erfolgte wie in Kapitel 2.4.9 beschrieben. Als Primer dienten die in Tabelle 5 beschriebenen Primer für *slyA*, Gyrase B (*gyrB*) und den Sigmafaktor *rpoD*. Da bei einer PCR die Produktmenge exponentiell ansteigt, besteht bei einer 100 %igen PCR Effizienz eine Verzehnfachung des Produkts nach 3,3 Zyklen. Aufgrund dessen wird bei qPCR Ansätzen stets auch eine 1:10 Verdünnung mit getestet, um die Effizienz der Reaktion zu überprüfen. Es wurden nur die Läufe ausgewertet, deren Effizienz bei mindestens 90 % lag.

Bei der Auswertung der qPCR mittels CFX Manager (BioRad, München) werden für jeden Lauf die Amplifikationskurve der untersuchten Gene, die Schmelzkurve der Primer, sowie der Schmelzpunkt angezeigt. In Abbildung 20 ist die Amplifikationskurve beispielhaft für *slyA* aus *P. aeruginosa* PA14 und PA14 Δ *slyA* gezeigt.

Bei mehr Ausgangstranskript wird in der Amplifikation schneller der Schwellwert erreicht, als bei einer sehr geringen Kopienzahl. Die Amplifikation befindet sich dann

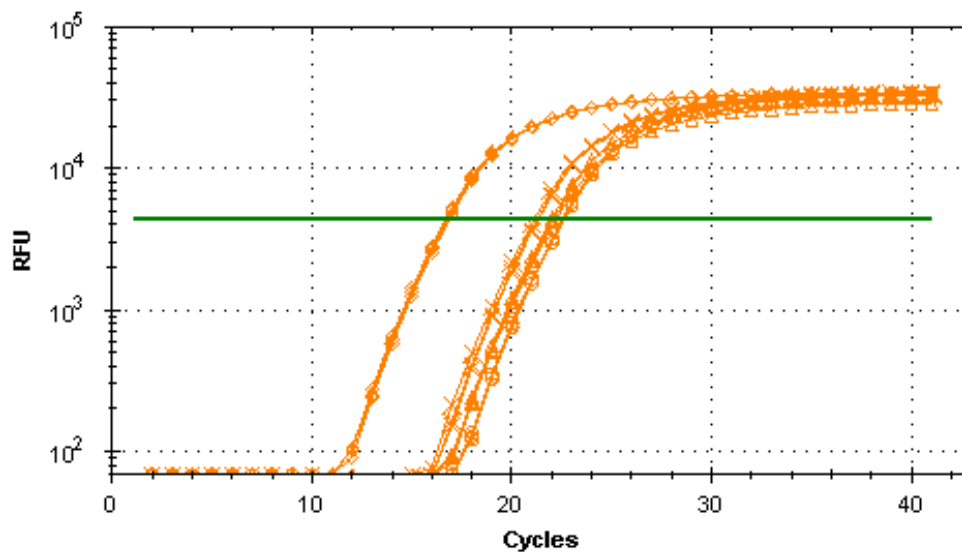


Abbildung 20: Beispielhafte Amplifikationskurve für die Amplifikation von *slyA* in *P. aeruginosa* PA14 Kulturen, inkubiert bei 37 °C für 2 h. X-Achse: Anzahl der Zyklen; Y-Achse: Relative Fluoreszenz Einheiten (RFU).

im linearen Bereich. In Abbildung 20 ist zu sehen, dass nach ca 16 Zyklen das Amplifikationsprodukt der *slyA* Primer detektiert werden kann. In der RNA Probe (PA14 \ddot{U}_{slyA}) ist das bereits nach 12 Zyklen der Fall. Es ist folglich, wie erwartet, mehr *slyA* Transkript in *P. aeruginosa* PA14 \ddot{U}_{slyA} produziert worden, als in PA14. Abbildung 21 zeigt die zu dem Lauf gehörige Genexpression von *P. aeruginosa slyA* in Abhängigkeit zur Temperatur. Für die vergleichende Quantifizierung ist die Menge an *slyA* Transkript, die von *P. aeruginosa* PAO1 bei 37 °C gebildet wurde, auf 1 gesetzt worden. Die weiteren Ergebnisse sind entsprechend über die Kontrollgene *gyrB* und *rpoD* normalisiert worden.

Bei der Überexpression von *slyA* in *P. aeruginosa* PAO1 \ddot{U}_{slyA} lag die normalisierte Expression bei 37 °C 38-fach höher als im Wildtyp. Bei 25 °C war die Expression in *P. aeruginosa* PAO1 1,5-fach so hoch wie bei 37 °C in PAO1. *P. aeruginosa* PA14 \ddot{U}_{slyA} zeigte bei 37 °C eine 13-fach höhere *slyA* Expression als PAO1 (37 °C). PA14 lag mit 1,3-facher *slyA* Expression etwas höher als *P. aeruginosa* PAO1.

P. aeruginosa PA14 \ddot{U}_{slyA} bildet folglich unter den betrachteten Bedingungen weniger *slyA* Transkript als *P. aeruginosa* PAO1 \ddot{U}_{slyA} , obwohl in *P. aeruginosa* PA14 1,3-fach mehr *slyA* gebildet wurde als in PAO1. Möglicherweise liegt die leicht erhöhte Expression am Überexpressionsplasmid, welches auf der Sequenz von *slyA* aus

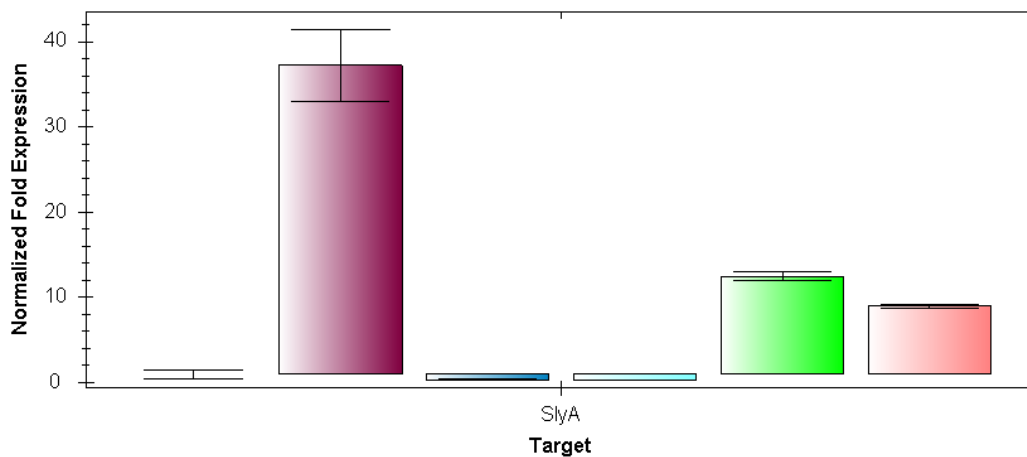


Abbildung 21: Genexpression von *P. aeruginosa slyA* in Abhängigkeit zur Temperatur. Menge an vorhandenem *slyA* Transkript in exponentiellen *P. aeruginosa* PAO1 und PA14 LB-Kulturen sowie den Überexpressionsstämmen PAO1 Δ *slyA* und PA14 Δ *slyA* bei 37 °C und 25 °C. Der Test erfolgte in Dreifachbestimmung. Proben: *P. aeruginosa* PAO1, 37 °C: blau; *P. aeruginosa* PAO1 Δ *slyA*, 37 °C, lila; *P. aeruginosa* PAO1, 25 °C: mittelblau; *P. aeruginosa* PA14, 37 °C: türkis; *P. aeruginosa* PA14 Δ *slyA*, 37 °C, grün; *P. aeruginosa* PA14 Δ *slyA*, 25 °C: rot.

PAO1 beruht. *slyA* aus *P. aeruginosa* PA14 weist aber lediglich drei abweichende Basen im Sequenzvergleich zwischen PAO1 und PA14 auf.

Generell konnte eine deutliche Temperaturabhängigkeit der Expression von *slyA* festgestellt werden. Bei allen untersuchten Stämmen wurde bei 25 °C mehr *slyA* Transkript nachgewiesen als bei 37 °C. Diese temperaturabhängige Expression des Transkriptionsregulators wurde für *rovA* aus *Y. pseudotuberculosis* ebenfalls beschrieben, die bei 25 °C erhöht war im Gegensatz zu 37 °C Kulturen (Nagel *et al.*, 2001, Heroven *et al.*, 2004).

3.5.2 SlyA-abhängige Expression von *exoS* und *exoU*

Die temperaturabhängige Aktivität von SlyA sollte noch genauer in weiteren Untersuchungen gezeigt werden. Dazu wurde der Einfluss von SlyA auf die Expression der Effektorproteine des TTSS untersucht. Die Expression von *exoS*, welches in *P. aeruginosa* PAO1 vorhanden ist, nicht aber in PA14, und *exoU*, welches in *P. aeruginosa* PA14 vorkommt, nicht aber in PAO1, wurden bei 25 °C und 37 °C untersucht. Die Primer gegen *exoS* und *exoU* sind in Tabelle 5 aufgeführt. Abbildung 22 zeigt die Genstudie dieser Analyse.

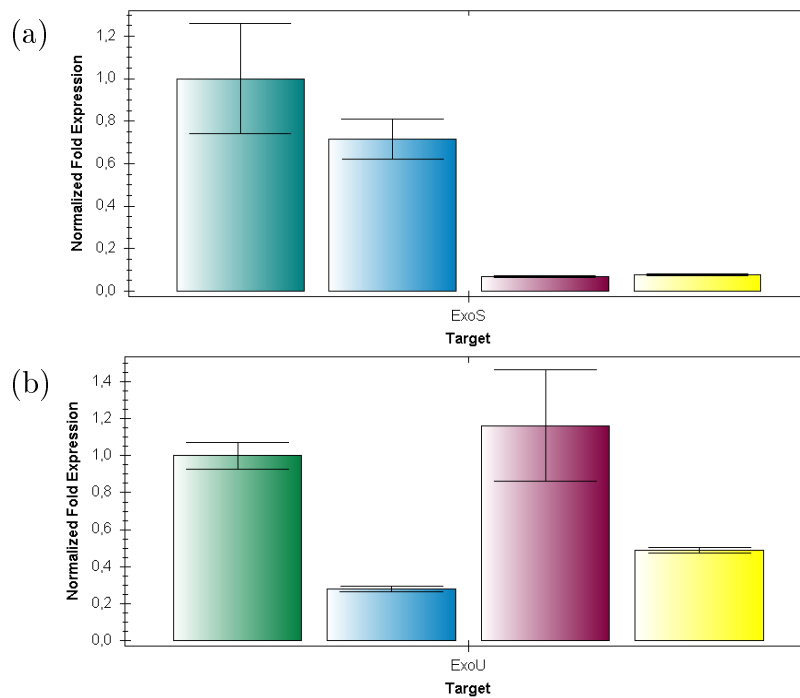


Abbildung 22: Genstudie von (a): *exoS* in *P. aeruginosa* PAO1 und PAO1 Δ *slyA* (b): *exoU* in *P. aeruginosa* PA14 und PA14 Δ *slyA*. Ergebnisse aus drei unabhängigen Untersuchungen jeweils in Dreifachbestimmung mit Standardabweichung. Grün: Wildtyp, 37 °C ; blau: Δ *slyA*, 37 °C ; lila: Wildtyp, 25 °C; gelb: Δ *slyA*, 25 °C.

Die *exoS* Expression (Abbildung (a)) von *P. aeruginosa* PAO1 bei 37 °C wurde in der Normalisierung auf 1 gesetzt. PAO1 Δ *slyA* zeigte bei 37 °C eine minimal verringerte Expression von *exoS* um das 0,3-fache. Bei 25 °C war die Expression von *exoS* in *P. aeruginosa* PAO1 deutlich geringer. Mit jeweils 0,07-facher Expression lagen *P. aeruginosa* PAO1 und PAO1 Δ *slyA* bei 25 °C unter einem Zehntel der PAO1 Expression bei 37 °C. Folglich lag *exoS* in dieser Untersuchung temperaturreguliert vor, ein SlyA Einfluss ist aber nicht eindeutig zu erkennen gewesen.

Für die Expression von *exoU* (Abbildung 22 (b)), welches nur in *P. aeruginosa* PA14 vorhanden ist, war die Expression sowohl bei 25 °C als auch bei 37 °C etwa gleich. Hier liegt folglich, anders als bei *exoS*, keine Temperaturregulation vor. Die *P. aeruginosa* PA14 Δ *slyA* Mutante erzielte bei 37 °C dagegen nur eine 0,3-fache Expression. Für *P. aeruginosa* PA14 Δ *slyA* bei 25 °C konnte eine 0,45-fache Expression festgestellt werden, was deutlich auf eine SlyA-abhängige Regulation hinweist.

Zusammenfassend konnte die inhibierende Wirkung von SlyA nur auf die Expression von *exoU* in *P. aeruginosa* PA14 gezeigt werden. Durch *Virtual Footprint* (Münch

et al., 2005) Analysen mit Hilfe des Bindebox-Motivs vom *E. coli* SlyA (Abbildung 23) wurde im *exoU* Gen eine SlyA Bindebox identifiziert. Eine solche Bindebox war im *exoS* Gen in *P. aeruginosa* PAO1 nicht vorhanden (Daten nicht veröffentlicht).

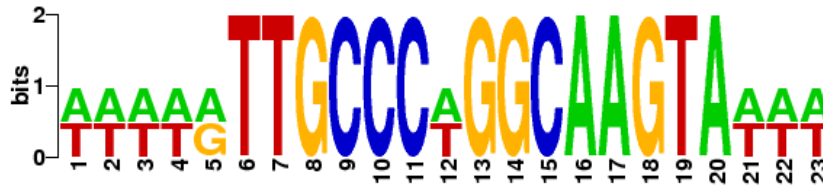


Abbildung 23: SlyA Bindebox-Motiv Sequenzlogo aus Prodoric, welches für die Virtual Footprint-Analyse verwendet wurde.

Eine temperaturabhängige Regulation dagegen konnte nur für die Expression von *exoS* in *P. aeruginosa* PAO1 gezeigt werden. Dieser Effekt ist folglich nicht direkt von SlyA abhängig. Denkbar wäre eine indirekte Regulation durch SlyA oder aber ein Einfluss durch einen weiteren, bislang unbekannten Regulator.

Um diese beobachtete Regulation der Expression von *exoU* durch SlyA auch auf die Aktivität der Effektorproteine *in vivo* zu untersuchen, wurde die Cytotoxizität mit *P. aeruginosa* PAO1, PAO1 Δ *slyA*, PA14 und PA14 Δ *slyA* getestet.

3.5.3 Temperaturabhängige Aktivität von ExoU und ExoS

Das Signalmolekül zur Regulation des TTSS in *P. aeruginosa*, zyklisches AMP (cAMP), wird mit Hilfe der beiden Adenylat Cyclasen CyaAB aus ATP synthetisiert, indem von ATP in einer Zyklisierungsreaktion zwei Phosphatgruppen (Pyrophosphat) abgespalten werden (Alberts *et al.*, 2004). Es wird vom cAMP-bindenden Protein Vfr wahrgenommen. Vfr reguliert dann das TTSS und andere Virulenzfaktoren in *P. aeruginosa* (Lory *et al.*, 2004). Für das SlyA Homolog PecS aus *E. chrysanthemi* ist bekannt, dass es die Transkription seiner Zielgene reprimiert, indem es mit der Bindestelle des cAMP am *cAMP Receptor Protein* S (CRP) konkurriert (Ellison und Miller, 2006, Rouanet *et al.*, 1999).

Der Einfluss von SlyA auf die Cytotoxizität von *P. aeruginosa* sollte untersucht werden. Dazu wurden *P. aeruginosa* PAO1, PAO1 Δ *slyA*, PA14 sowie PA14 Δ *slyA* im Cytotoxizitätstest untersucht. Zusätzlich wurde der Einfluss der Temperatur untersucht, indem die *P. aeruginosa* Kulturen sowohl bei 37 °C (2 h), als auch bei 25

°C (4 h) angezogen wurden. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Abbildung 24 dargestellt.

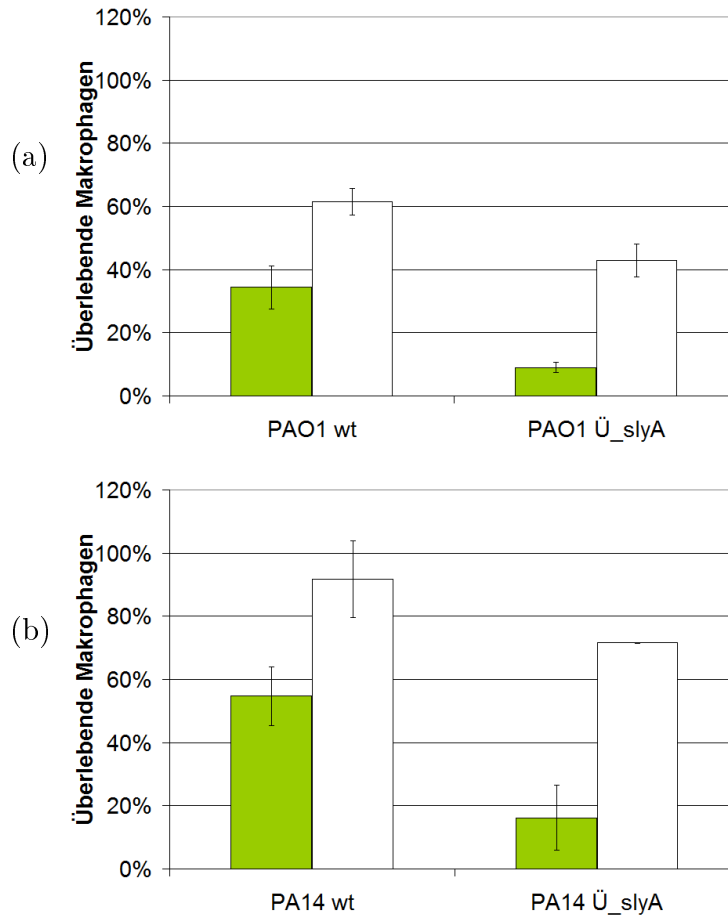


Abbildung 24: Temperatureinfluss auf die Cytotoxizität von *P. aeruginosa* PAO1 und PA14. Gezeigt ist die Menge (%) überlebender Makrophagen (J774) nach (a) dreistündiger Infektion mit *P. aeruginosa* PAO1 bzw. PAO1 Ü_slyA Kulturen, (b) 30 minütiger Infektion bei *P. aeruginosa* PA14 und PA14 Ü_slyA. Die Anzucht der *P. aeruginosa* Kulturen fand bei 25 °C (weiß) für 4 h und bei 37 °C (grün) für 2 h (200 rpm, aerob) in LB, statt. Der Test erfolgte in Doppelbestimmung in drei unabhängigen Untersuchungen.

Wie zu sehen ist, nimmt die Cytotoxizität von *P. aeruginosa* PAO1 bei der Überexpression von *slyA* deutlich zu (Abbildung (a)). So wurde nach dreistündiger Infektion mit Kulturen, die bei 37 °C inkubiert wurden, eine Verringerung der Überlebensrate der murinen Makrophagen (J774) um 25 % festgestellt. Wurden die Bakterien bei 25 °C inkubiert, so war die Cytotoxizität mit 61,5 % überlebender Makrophagen generell geringer als bei 37 °C angezogenen Kulturen. Auch hier war eine Steigerung in der

Cytotoxizität von *P. aeruginosa* PAO1 Δ *slyA* um 20 % zu beobachten, es überlebten lediglich 42,8 % der Makrophagen.

Die Infektion der murinen Makrophagen mit den *P. aeruginosa* PA14 Stämmen (Abbildung 24 (b)) wurde auf eine Infektionszeit von 30 min verkürzt, da nach dreistündiger Infektion der Makrophagen lediglich noch 1,5 % überlebende Zellen detektiert werden können (siehe Tabelle 34) und somit keine Steigerung der Cytotoxizität durch die Überexpression von *slyA* sichtbar wäre. Nach 30 min konnten bei Infektion mit *P. aeruginosa* PA14 37 °C Kulturen noch 54,7 % überlebende Makrophagen detektiert werden. In PA14 Δ *slyA* waren es nur noch 16,2 %, was einer Steigerung der Cytotoxizität um fast 40 % entspricht. Bei 25 °C Kulturen dagegen überlebten die PA14 Infektion 91,8 %, die PA14 Δ *slyA* Infektion 71,6 % der Makrophagen. Auch bei *P. aeruginosa* PA14 ist folglich eine 20 %ige Zunahme der Cytotoxizität durch die Überexpression von *slyA* erkennbar, wobei in Kulturen, die bei 25 °C angewachsen sind, die Cytotoxizität wesentlich geringer war (PA14: 91,8 % überlebende Makrophagen) als in den 37 °C Kulturen (54,7 % überlebende Makrophagen).

SlyA scheint folglich auf die Aktivität der Effektorproteine des TTSS positiven Einfluss zu nehmen. Dies war sowohl bei *P. aeruginosa* PAO1 für ExoS, als auch bei PA14 für ExoU zu beobachten. Ein Effekt auf die Expression von *exoS* dagegen konnte nicht festgestellt werden. Da dieser Effekt der positiven Regulierung der Enzymaktivität von ExoS für *P. aeruginosa* PAO1 sowohl bei 25 °C als auch bei 37 °C zu beobachten war, ist hier allerdings kein direkt SlyA abhängiger Einfluss der Temperatur auf die Aktivität der Effektorproteine des TTSS sichtbar. Möglicherweise ist SlyA aber in der Lage, einen indirekten Effekt auf das TTSS oder aber die Regulation des TTSS auszuüben, wie es bereits für den Effekt des PQS Signals auf das TTSS von *P. aeruginosa* bekannt ist (Singh *et al.*, 2010). Bei RovA aus *Y. pseudotuberculosis* wird beispielsweise eine Eisen-abhängige Aktivität des Regulators diskutiert (persönliche Mitteilung P. Dersch). Die Menge an gebildetem *exoU*-Transkript, dass sich in der qPCR nachweisen ließ, war in der Überexpression sowohl bei 25 °C als auch bei 37 °C geringer als im Wildtyp (Kapitel 3.5.1, Abbildung 22). Die Aktivität *in vivo* war dagegen höher als im Wildtyp, da weniger Makrophagen die Infektion überlebten.

Möglicherweise wird die RNA in *P. aeruginosa* PA14 Δ *slyA* stabilisiert und ermöglicht so eine erhöhte Translationsrate. Dieser Effekt ist bereits von kleinen regulatorischen RNAs (sRNA) bekannt, die ebenfalls über unterschiedliche RNA Stabilität und daraus resultierenden Halbwertszeiten die Translation von mRNA beeinflussen (Fröhlich und Vogel, 2009).

Die beobachtete positive Regulation der Effektorproteine des TTSS deutet auf eine Funktion von SlyA als Aktivator hin und steht somit im Gegensatz zu den Beobachtungen in den Beweglichkeitstests (Kapitel 3.5.4). Dort konnte ein reprimierender Effekt von SlyA auf die Schwimm- und Schwärm-Bewegung von *P. aeruginosa* PAO1 (Flagellen) beobachtet werden. Positive Regulation von SlyA und SlyA-homologen Transkriptionsfaktoren wurde in der Literatur bereits mehrfach beschrieben. So zeigte SlyA in *Salmonella* eine positive Regulation der *Salmonella* Pathogenitätsinsel 2 (SPI-2), welche für dessen Typ III Sekretionssystem kodiert (Fass und Groisman, 2009). Die Expression der Flagellen Gene, und somit das Schwimmen der Bakterienzellen, wird in *E. coli* von SlyA ebenfalls positiv reguliert (Simms und Mobley, 2008). Auch negative Regulation wurde für Mitglieder der MarR Familie bereits beschrieben. Beispielsweise wurden für SlyA aus *S. typhimurium* 31 Zielgene identifiziert, von denen 23 positiv und 8 negativ reguliert werden (Navarre *et al.*, 2005, Ellison und Miller, 2006). Zudem wurde sowohl für *slyA* aus *S. typhimurium*, als auch für RovA aus *Y. pseudotuberculosis* eine Autorepression gezeigt, wobei RovA sich auch selbst aktivieren kann (Stapleton *et al.*, 2002, Heroven *et al.*, 2004).

3.5.3.1 Wachstumsphasenabhängigkeit der Cytotoxizität

Die Infektion der murinen Makrophagen (J774) im Cytotoxizitätstest wird üblicherweise mit exponentiell wachsenden Kulturen durchgeführt. In Stationärphasekulturen wurde eine erhöhte *slyA* Expression im Vergleich zu exponentiellen Kulturen festgestellt (persönliche Mitteilung S. Thomas). Um zu testen, ob auch in Stationärphasekulturen das TTSS aktiv ist und dessen Aktivität von SlyA beeinflusst wird, wurden die *P. aeruginosa* Kulturen bis zur Stationärphase für 18 h bei 37 °C bzw. für 22 h bei 25 °C (200 rpm) angezogen. Die Infektion mit den *P. aeruginosa* Stämmen PAO1, PAO1 Δ *slyA* (Abbildung 25(a)), sowie PA14 und Δ *slyA*, (Abbildung 25(b)) wurde nach 3 h abgestoppt und die Überlebensrate der Makrophagen getestet.

Nach Infektion der murinen Makrophagen (J774) mit *P. aeruginosa* Stationärphasekulturen konnte kaum Absterben bei den Makrophagen beobachtet werden (siehe Abbildung 25). So lebten nach dreistündiger Infektion mit 25 °C Kulturen von *P. aeruginosa* PAO1 noch 89,0 % und nach Infektion mit *P. aeruginosa* PAO1 Δ *slyA* noch 82,4 % der Makrophagen. Bei einer Infektion mit 37 °C Kulturen überlebten in beiden Fällen 100 % der Makrophagen.

Bei *P. aeruginosa* PA14 überlebten sowohl bei Makrophageninfektionen mit 25 °C Kulturen als auch bei 37 °C Kulturen zwischen 98 % und 100 % der Makrophagen.

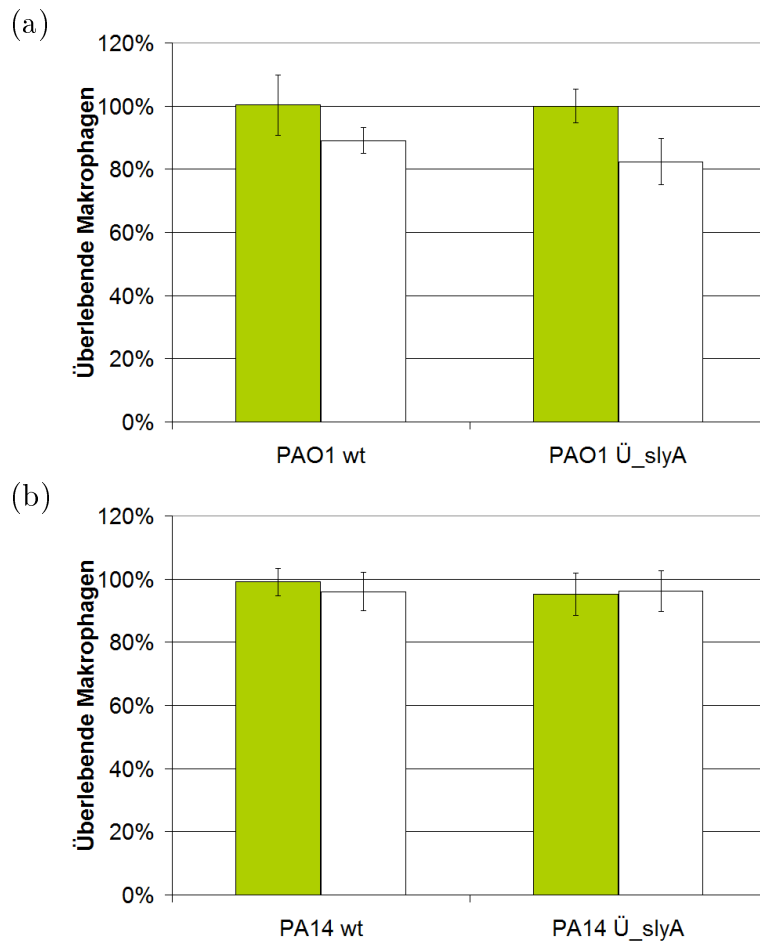


Abbildung 25: Cytotoxizitätstest von *P. aeruginosa* Stationärphase-Kulturen. Gezeigt ist die Anzahl (%) überlebender Makrophagen (J774) nach dreistündiger Infektion mit (a) *P. aeruginosa* PAO1 bzw. PAO1 Δ slyA Kulturen, (b) *P. aeruginosa* PA14 und PA14 Δ slyA. Die Anzucht der *P. aeruginosa* Kulturen fand bei 25 °C (weiß) für 22 h und bei 37 °C (grün) für 18 h (200 rpm), jeweils in LB, statt. Der Test erfolgte in Doppelbestimmung in drei unabhängigen Untersuchungen.

Nach Infektion mit beiden untersuchten *P. aeruginosa* Stämmen PAO1 und PA14 war nach der Infektion kaum Absterben der Makrophagen zu beobachten. Die Effektorproteine des TTSS scheinen folglich in Stationärphasekulturen kaum aktiv zu sein. Dieser Effekt wurde ebenfalls in der Literatur beschrieben. Es wurde bereits gezeigt, dass der Regulator der Stationärphase RpoS, sowie das RhlRI QS-System die Expression von *exoS* in Stationärphasekulturen signifikant verringern (Hogardt *et al.*, 2004). Der Aktivator des TTSS *PsrA* aktiviert ebenfalls die Expression von *RpoS*, sodass in Stationärphasekulturen die Expression der Effektorproteine des TTSS inhibiert wird (Shen *et al.*, 2006). Auch ein Einfluss der Überexpression von *slyA* konnte in der Cytotoxizi-

tät der *P. aeruginosa* Stationärphasekulturen nicht beobachtet werden. SlyA scheint demnach nur in exponentieller Phase Einfluss auf die Effektorproteine des TTSS zu nehmen.

Bei 37 °C war die Expression 4-5-fach verringert. Für das *slyA* Holog *rovA* aus *Y. pseudotuberculosis* wurde ebenfalls beschrieben, dass bei 25 °C die *rovA* Expression etwa 5-fach hochreguliert war, verglichen mit 37 °C Stationärphasekulturen (Nagel *et al.*, 2001). Da in qPCR Studien gezeigt wurde, dass die Expression von *slyA* sowohl in *P. aeruginosa* PAO1 als auch PA14 bei 25 °C in der Stationärphase am höchsten war, liegt hier möglicherweise, wie für SlyA aus *S. typhimurium* und RovA aus *Y. pseudotuberculosis* beschrieben, eine Autorepression vor (Stapleton *et al.*, 2002, Heroven *et al.*, 2004).

In exponentiellen *P. aeruginosa* Kulturen war die Expression von *slyA* im Vergleich zu den Stationärphasekulturen um ein Drittel verringert. Auch dieser Effekt konnte in *Y. pseudotuberculosis* für *rovA* gezeigt werden (Nagel *et al.*, 2001). Allerdings reguliert *RovA* die Expression des Invasins *inv* seiner eigenen Expression entsprechend (Nagel *et al.*, 2001, Heroven *et al.*, 2004), was bei *SlyA* nicht beobachtet werden konnte, da nur in den exponentiellen Kulturen ein Einfluss auf die Effektorproteine des TTSS festgestellt werden konnte. Ergänzend dazu wurde beobachtet, dass *slyA* aus *S. typhimurium* vom Zwei-Komponenten-System PhoPQ direkt über eine Bindebox aktiviert wird (Norte *et al.*, 2003, Shi *et al.*, 2004). *SlyA* aus *S. typhimurium* inhibiert dagegen seine eigene Expression, indem es an seinen Promotor bindet und so der RNA Polymerase den Zugang versperrt (Stapleton *et al.*, 2002). Eine Form der Autoregulation ist für *RovA* ebenfalls beschrieben, jedoch sowohl aktivierend als auch reprimierend (Heroven *et al.*, 2004). Dieser Unterschied könnte ein Grund für die unterschiedlichen Regulationszeitpunkte von *RovA* und *SlyA* an deren Zielgenen sein.

3.5.4 Charakterisierung der Mobilität verschiedener uropathogener *P. aeruginosa* Stämme

P. aeruginosa PAO1 und PA14, sowie deren *slyA* Überexpressionsstämme PAO1 \ddot{U}_{slyA} und PA14 \ddot{U}_{slyA} , wurden mittels Testagarplatten auf ihre Fähigkeit zum Schwimmen, Schwärmen und zur *Twitching Motility* untersucht (siehe Kapitel 2.2.4, O'Toole und Kolter, 1998, Mattick, 2002, Köhler *et al.*, 2000). Bei Bewegungs-positiven Keimen wurde der gebildete Hof vermessen. Abbildung 26 zeigt Beispielplatten für positive Ergebnisse.

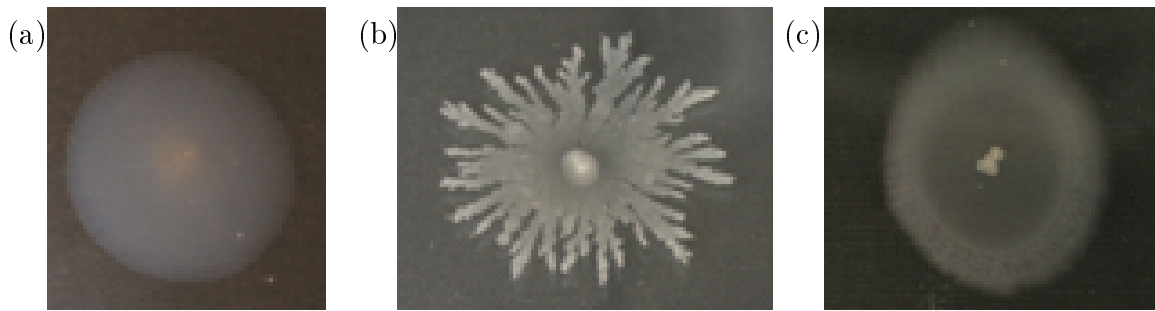


Abbildung 26: Die drei unterschiedlichen Bewegungsformen von *P. aeruginosa*. Beispielplatten für (a): Schwimmbewegung (b): Schwärmbewegung, (c): *Twitching Motility*.

Der sich bildende Hof bei Schwimmbewegungs-positiven Keimen ist in Abbildung 26 (a) gezeigt. Er breitet sich meist gleichmäßig über die Platte aus. Beim Schwärmen (Abbildung 26 (b)) bilden sich Dendriten-artige Verzweigungen aus, die alle von der Animpfstelle her beginnen. Bei der *Twitching Motility* (Abbildung 26 (c)) ist ein trüber Hof um die Einstichstelle zu sehen, der sich, im Gegensatz zu den Höfen bei Schwimmen und Schwärmen, auf dem Plattenboden befindet. Die Ergebnisse der Untersuchungen für die Bestimmung der Beweglichkeiten von *P. aeruginosa* PAO1 und PA14, inklusive der *slyA* Überexpressionsstämme PAO1 Δ *slyA* und PA14 Δ *slyA*, sind in Abbildung 27 zusammengefasst.

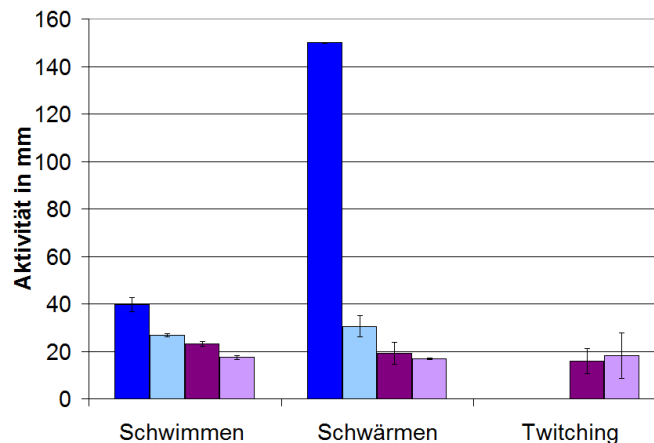


Abbildung 27: Mobilität von *P. aeruginosa* PAO1, PA14, PAO1 Δ *slyA*, PA14 Δ *slyA*. Gezeigt ist die Aktivität in mm nebst Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung. Stämme: blau: *P. aeruginosa* PAO1; hellblau: *P. aeruginosa* PAO1 Δ *slyA*; violett: *P. aeruginosa* PA14; flüchtig: *P. aeruginosa* PA14 Δ *slyA*.

Alle untersuchten Stämme waren zum Schwimmen und Schwärmen in der Lage. Sie besitzen Flagellen, die ihnen diese Form der Bewegung ermöglichen (O'Toole und Kolter, 1998). Die Aktivität beim Schwimmen war bei *P. aeruginosa* PAO1 mit 40 mm am höchsten. *P. aeruginosa* PA14 erzielte 23 mm. Die Aktivität der *slyA* Überexpressionsstämme lag unterhalb der von PAO1 und PA14. So erzielte *P. aeruginosa* PAO1 \ddot{U} _slyA 27 mm, PA14 \ddot{U} _slyA erreichte 17 mm. Auch in der Schwärm-Aktivität, welche sowohl von Flagellen, als auch von Typ IV Pili vermittelt wird, zeigte *P. aeruginosa* PAO1 mit 150 mm die höchste Aktivität, *P. aeruginosa* PA14 erreichte 19 mm (Köhler *et al.*, 2000). Die Schwärm-Aktivität von *P. aeruginosa* PAO1 \ddot{U} _slyA (31 mm) war im Gegensatz zu PAO1 um 80 % verringert. Bei *P. aeruginosa* PA14 \ddot{U} _slyA konnten noch 17 mm festgestellt werden, was einer um 10,5 % verringerten Aktivität entspricht. Hier ist ein Einfluss von SlyA kaum erkennbar im Vergleich zu *P. aeruginosa* PAO1.

Die *Twitching Motility* konnte nur von *P. aeruginosa* PA14 und PA14 \ddot{U} _slyA durchgeführt werden, da *P. aeruginosa* PAO1 keine funktionellen Typ IV Pili ausbildet, welche hierfür benötigt werden (Mattick, 2002). Es scheint keinen Einfluss von SlyA auf die Expression der Gene der Typ IV Pili zu geben, da die Aktivität von *P. aeruginosa* PA14 bei 18 mm, die von PA14 \ddot{U} _slyA bei 16 mm lag.

Diese deutliche Abnahme der Aktivität, sowohl beim Schwimmen als auch beim Schwärmen, weist auf einen positiven Einfluss von SlyA auf die Regulation der Flagellengene hin. Für SlyA aus *E. coli* wurde eine gegensätzliche Beobachtung gemacht. So stellten Simms und Mobley fest, dass eine Deletion von *slyA* in uropathogenen *E. coli* Stämmen zu einer Verminderung der Schwimm-Aktivität führte (Simms und Mobley, 2008). Dies ist ein Hinweis, dass es sich bei dem *P. aeruginosa* SlyA um einen Repressor handeln könnte.

3.5.5 Bestimmung des SlyA Regulons in *P. aeruginosa* PAO1

Da bislang nur sehr wenig über die Zielgene von SlyA in *P. aeruginosa* bekannt ist, sollten diese mittels Transkriptomanalyse des *slyA* Überexpressionsstamms PAO1 \ddot{U} _slyA herausgefunden werden. Es wurden LB Kulturen von *P. aeruginosa* PAO1 und PAO1 \ddot{U} _slyA 4 h bei 25 °C (200 rpm) angezogen, die RNA wurde isoliert (siehe Kapitel 2.4.5), zu cDNA umgeschrieben und für die Affymetrix Mikroarrays vorbereitet (Kapitel 2.4.7 bis 2.4.8). Für die Auswertung wurde eine Regulation über 2-fach als signifikant angesehen. Insgesamt waren 40 Gene in der *slyA* Überexpression induziert und

100 Gene, sowie zwei intergenische Regionen reprimiert. Die Aufteilung der regulierten Gene in ihre funktionellen Gruppen ist in Abbildung 28 zusammengefasst.

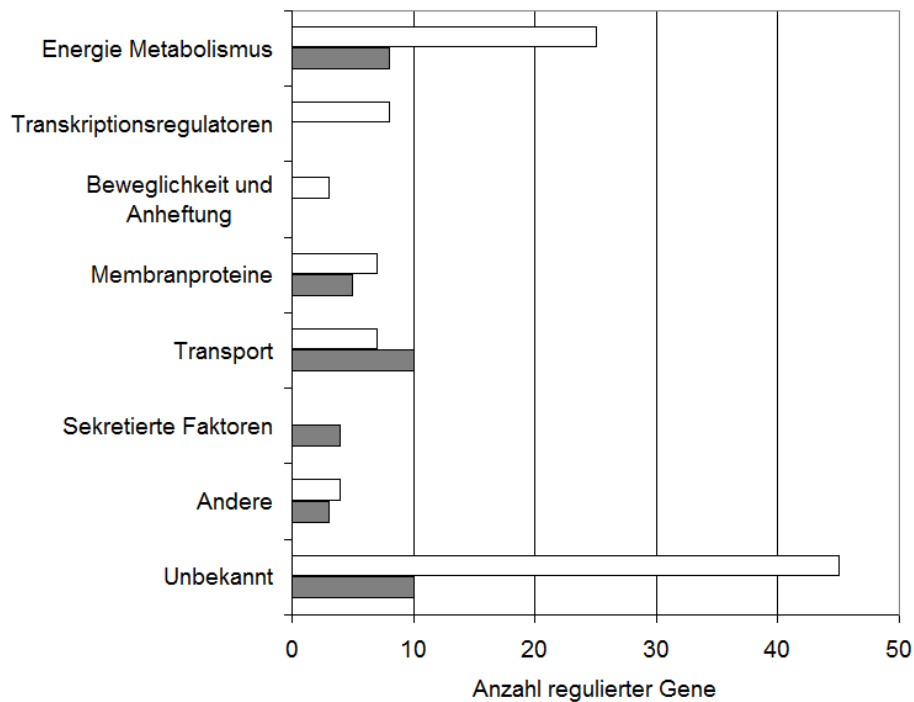


Abbildung 28: Zusammenfassung differentiell regulierter Gene in *P. aeruginosa* PAO1 und PAO1 Δ_{slyA} und deren Einteilung in funktionelle Gruppen. Exponentielle Kulturen in LB, 25 °C, 200 rpm. Weiß: reprimiert; grau: induziert.

Die komplette Liste der regulierten Gene ist im Anhang (Tabellen 44 und 45) zu finden. Tabelle 37 zeigt einige ausgewählte induzierte Gene, deren Regulation und Funktion.

Ein bereits aus *P. putida* bekanntes Operon, bestehend aus *zwf*, *pgl* und *eda* lag etwa dreifach induziert vor und wird üblicherweise durch Kohlenhydrate induziert (Petruschka *et al.*, 2002). Die drei Gene codieren für eine 2-keto-3-deoxy-6-Phosphogluconat Aldolase (*edaA*), eine 6-Phosphogluconolactonase (*pgl*), sowie eine Glucose-6-Phosphat 1-Dehydrogenase (*zwf*) und sind involviert im Glucose Katabolismus über den Emden-Doudoroff Weg (Lessie und Phibbs Jr, 1984). Die vierfach induzierte Gluconat Dehydrogenase (PA2265, *gad*) ist ebenfalls im Kohlenstoff Katabolismus über den Pentose-Phosphat Weg involviert und setzt Gluconat zu 2-Dehydrogluconat um (Yum *et al.*, 1997). Zudem wurde das Gen für die Acetyl-CoA-Synthetase *acsA* fünffach induziert vorgefunden (Kretzschmar *et al.*, 2001). All diese Gene deuten auf einen Effekt von SlyA auf den Kohlenhydrat Stoffwechsel sowie den Energiestoffwechsel von *P. aeruginosa* hin. Ein solcher Einfluss ist für SlyA bislang noch nicht beschrieben worden.

Tabelle 37: Ergebnisse der Transkriptomanalyse ausgewählter induzierter Gene von PAO1 \ddot{U}_{slyA} unter aeroben Bedingungen, exponentielle Phase, 25 °C, 200 rpm, LB.

PA- Nummer	Gen	Beschreibung	n-fache Regulation
Eisenaufnahme			
PA4230	<i>pchB</i>	Salicylat Biosynthese Protein PchB	1,99
PA4229	<i>pchC</i>	Pyochelin Biosynthese Protein PchC	2,09
PA4228	<i>pchD</i>	Pyochelin Biosynthese Protein PchD	2,08
PA4226	<i>pchE</i>	Dihydroaeruginoat Synthetase	3,27
PA4224	<i>pchG</i>	Pyochelin Biosynthese Protein PchG	2,04
PA4223	<i>pchH</i>	Mögliche ATP-bindende Komponente, ABC Transporter	2,07
PA4221	<i>fptA</i>	Fe(III)-Pyochelin Rezeptor (OM)	9,57
PA4220		Hypothetisches Protein	12,27
PA2398	<i>fpvA</i>	Ferripyoverdin Rezeptor	7,33
Metabolismus			
PA3181	<i>edaA</i>	2-keto-3-deoxy-6-Phosphogluconat Aldolase	3,29
PA3182	<i>pgl</i>	6-Phosphogluconolactonase	3,25
PA3183	<i>zwf</i>	Glucose-6-Phosphat 1-Dehydrogenase	3,00
PA0887	<i>acsA</i>	Acetyl-Coenzym A Synthetase	5,44
PA2265	<i>gad</i>	Gluconat Dehydrogenase	4,29
PA2322	<i>gntU</i>	Gluconat Permease	2,37
PA5445	<i>psecoA</i>	Mögl. Coenzym A Transferase	2,38
PA2247	<i>bkdA1</i>	2-Oxoisovalerat Dehydrogenase	2,04
PA3195	<i>gapA</i>	Glyceraldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase	2,17
PA4770	<i>lldP</i>	L-Lactat Permease	2,30

Da die Untersuchungen des Transkriptoms mit PAO1 und PAO1 \ddot{U}_{slyA} erfolgten, und PAO1 von den Effektorproteinen des TTSS *exoS*, nicht aber *exoU* exprimiert, konnte der beobachtete *slyA* Effekt auf die Expression von *exoU*, nicht betrachtet werden. In den durchgeführten qPCR Studien, sowie dem Test auf Cytotoxizität konnte kein direkter Einfluss von SlyA auf die Expression von *exoS* oder aber die Aktivität von ExoS beobachtet werden. Auch eine SlyA Bindebox wurde nicht gefunden. Dies deckt sich gut mit dem Ergebnis der Transkriptom Untersuchungen, da auch hier kein Effekt von SlyA auf die Expression von *exoS* beobachtet werden konnte.

Unter den reprimierten Genen waren 45 von 100 Genen, deren Funktion nicht zugeordnet werden konnte. Tabelle 38 zeigt eine Auswahl an durch *slyA* reprimierten Genen.

In den reprimierten Genen zeigt sich ein deutlicher Einfluss von SlyA auf den anaeroben Metabolismus. So wurden 10 Gene reprimiert vorgefunden, die für Cytochrom Untereinheiten oder für Cytochrom C kodieren. PA1555, PA1556 und PA1557, die für die *cbb₃-2* Oxidase kodieren sind homolog zum *fixNOPQ* Operon von *Rhizobia*,

Tabelle 38: Ergebnisse der Transkriptomanalyse ausgewählter reprimierter Gene von PAO1 Ü_ *slyA* unter aeroben Bedingungen, exponentielle Phase, 25 °C, 200 rpm, LB.

PA- Nummer	Gen	Beschreibung	n-fache Regulation
Anaerober Metabolismus			
PA0519	<i>nirS</i>	Nitrit Reduktase Vorläufer	0,18
PA0836	<i>ackA</i>	Acetat Kinase	0,24
PA1546	<i>hemN</i>	Sauerstoffunabhängige Coproporphyrinogen III Oxidase	0,13
PA5170	<i>arcD</i>	Arginin/Ornithin Antiporter	0,10
PA5171	<i>arcA</i>	Arginin Deiminase	0,33
PA2119	<i>adh</i>	Alkohol Dehydrogenase	0,11
PA5427	<i>adhA</i>	Alkohol Dehydrogenase	0,10
PA3309	<i>uspK</i>	Universelles Stressprotein	0,11
Cytochrome			
PA1317	<i>cyoA</i>	Cytochrom O Ubiquinol Oxidase UE II	0,51
PA1318	<i>cyoB</i>	Cytochrom O Ubiquinol Oxidase UE I	0,47
PA1319	<i>cyoC</i>	Cytochrom O Ubiquinol Oxidase UE III	0,42
PA1320	<i>cyoD</i>	Cytochrom O Ubiquinol Oxidase UE IV	0,47
PA1555	<i>ccoP</i>	Mögliches Cytochrom C	0,32
PA1556	<i>ccoO</i>	Mögliche Cytochrom C Oxidase UE	0,15
PA1557	<i>ccoN</i>	Mögliche Cytochrom Oxidase UE (cbb3-type)	0,12
PA4133	<i>ccoN</i>	Cytochrom C Ubiquinol Oxidase UE (cbb3- type)	0,07
PA4571		Mögliches Cytochrom C	0,24
PA4587	<i>ccpR</i>	Cytochrom C551 Peroxidase Vorläufer	0,16
Transkriptionsregulatoren			
PA0527	<i>dnr</i>	Transkriptionsregulator Dnr	0,08
PA3006	<i>psrA</i>	Transkriptionsregulator PsrA	0,47
PA3879	<i>narL</i>	Zwei-Komponentenregulator NarL	0,29
PA1196		Möglicher Transkriptionsregulator	0,13
PA2432		Möglicher Transkriptionsregulator	0,19
PA3458		Möglicher Transkriptionsregulator	0,43
PA4596		Möglicher Transkriptionsregulator	0,30
Biofilmbildung			
PA2128	<i>cupA1</i>	Fimbrien Untereinheit CupA1	0,15
PA2129	<i>cupA2</i>	Chaperon CupA2	0,23
PA2132	<i>cupA5</i>	Chaperon CupA5	0,49

welches unter Sauerstoff-Limitierung exprimiert wird (Preisig *et al.*, 1993, Schobert und Tielen, 2010). Das Operon *cyoABCDE* kodiert eine Cytochrom bo_3 Oxidase und lag reprimiert vor, wobei *cyoE* nur 1,4-fach reprimiert vorlag (Chepuri *et al.*, 1990, Kawakami *et al.*, 2010). Cytochrom C ist ein wichtiger Bestandteil der Elektronentransportkette und wird bei der Denitrifikation benötigt (Zumft, 1997). Ein weiterer Hinweis, dass es sich bei *slyA* um einen Repressor des anaeroben Metabolismus handelt, liegt in der etwa 12-fachen Reprimierung von *dnr*, einem Regulator des anaeroben Metabolismus, welcher, wie auch Anr, zur FNR-Familie von Transkriptionsregulatoren

gehört (Arai *et al.*, 1995). Dnr induziert unter anderem *nirS*, welches etwa fünffach reprimiert vorlag und während der Denitrifizierung als Nitritreduktase fungiert (Arai *et al.*, 1995). Neuste Studien mit *P. aeruginosa* PA14 zeigten, dass NirS ebenfalls für die Expression von *exoU*, einem Effektorprotein des TTSS, benötigt wird (Van Alst *et al.*, 2009). Auch die Gene des Zwei-Komponenten-Systems NarXL, welches seine Aktivität abhängig von der Konzentration an Nitrat über die Sensorkinase NarX und den Regulator NarL reguliert (Krieger *et al.*, 2002), lagen reprimiert vor, *narX* etwa 1,5-fach, *narL* etwa 3-fach.

Es wurde ebenfalls ein Einfluss von SlyA auf die Arginin Fermentation festgestellt, in der Arginin über den Arginin-Ornithin Antiporter ArcD in die Zelle eingeschleust wird und durch ArcABC zu CO₂ und NH₃ abgebaut wird (Benkert *et al.*, 2008). Das Operon ArcDABC wird von NarL reprimiert (Benkert *et al.*, 2008). Die Gene *arcD*, sowie *arcA* lagen etwa 10-fach bzw. 3-fach reprimiert vor, die Gene *arcB* und *arcC* wurden nicht differentiell exprimiert. Das Gen für die Acetat-Kinase *ackA*, die an der Pyruvat Fermentation zu Acetat beteiligt ist (Eschbach *et al.*, 2004), lag 4-fach reprimiert vor, die weiteren Gene dieses Stoffwechselwegs wurden aber nicht differentiell reguliert.

Über zwei weitere Transkriptionsregulatoren, die durch die Überexpression von *slyA* in *P. aeruginosa* PAO1 reprimiert wurden, gibt es bereits erste Untersuchungen zu deren Funktion. So ist PA1196 an der Regulation des QS Systems beteiligt, indem es das Rhl- und das PQS-System positiv beeinflusst (Liang *et al.*, 2009). PA2432 gehört zu der Familie der LysR Regulatoren und ist ein bistabiler Expressionsregulator, der in der exponentiellen Phase in *P. aeruginosa* PAO1 LB Kulturen zu heterogenen Expression von Virulenzfaktoren in einer Population führt (*bexR*, Turner *et al.*, 2009).

Für die Biofilmbildung auf abiotischen Oberflächen nutzt *P. aeruginosa* das *cupA* Operon, welches aus fünf Genen besteht und, wie auch PA2432 (*bexR*), bistabil exprimiert wird (Vallet *et al.*, 2001, Vallet-Gely *et al.*, 2007). Drei davon (*cupA1*, *cupA2*, *cupA5*) wurden durch die Überexpression von *slyA* in *P. aeruginosa* PAO1 reprimiert. Die Regulation des *cupA* Operons wird, zusätzlich zu der SlyA Regulation, durch Anr und CgrABC positiv, und durch MvaT negativ beeinflusst (Vallet *et al.*, 2004, Vallet-Gely *et al.*, 2007). Auch hier zeigt sich ein Einfluss von SlyA auf die Regulation der *P. aeruginosa* Genexpression unter anaeroben Bedingungen. Bereits in mehreren Untersuchungen des anaeroben Stoffwechsels von *P. aeruginosa* zeigte sich ein Zusammenspiel der Regulatoren Dnr, Anr und NarXL, ähnlich dem Effekt der *slyA* Überexpression (Krieger *et al.*, 2002, Schreiber *et al.*, 2007, Trunk *et al.*, 2010). Zudem zeigte die

slyA Überexpression eine reprimierte Expression von *hemN*, welches unter anaeroben Bedingungen Anr abhängig reguliert wird (Rompf *et al.*, 1998).

Von den 40 induzierten Genen waren 10 unbekannter Funktion. Bei Überexpression von *slyA* in *P. aeruginosa* PAO1 zeigten sich Hinweise, dass SlyA an der positiven Regulation der Eisenaufnahme in *P. aeruginosa* PAO1 über Pyochelin beteiligt ist. Es wurden fünf Gene der Pyochelin Biosynthese induziert vorgefunden (*pchB*, *pchC*, *pchD*, *pchE*, *pchG*). Pyochelin zählt zu den von *P. aeruginosa* sekretierten Molekülen und ist als sekundärer Siderophor an der Eisenaufnahme beteiligt (Britigan *et al.*, 1997, Cornelis, 2010). Pyochelin wird über den spezifischen Transporter FptA in der äußeren Membran in die Zelle geschleust, dessen Gene *fptA* und *fptB* ebenfalls induziert vorlagen (Braud *et al.*, 2009, Michel *et al.*, 2007). *fpvA*, das Gen eines Ferripyoverdin Rezeptor (Poole *et al.*, 1993, Greenwald *et al.*, 2008), wurde ebenfalls siebenfach induziert vorgefunden.

Bei der SlyA Bindeboxenanalyse *in silico* via *Virtual Footprint* (Münch *et al.*, 2005) mit Hilfe der Bindeboxsequenz aus *E. coli* (siehe Abbildung 23) wurden in 15 Genen Bindeboxmotive für SlyA vorhergesagt. Drei vorhergesagte Bindeboxen sind in Tabelle 39 aufgelistet. Sie beinhaltet das Bindebox-Motiv, sowie die jeweilige Entfernung zum Startcodon des Gens.

Tabelle 39: Bindeboxanalyse slyA

PA- Nummer	Gen	Bindebox Motiv	Abstand zum ATG
PA4392	<i>pvdP</i>	TAAATTTGCCGACGGAAGGAACG	-46
PA4393	<i>pvdM</i>	TAAATTTGCCGACGGAAGGAACG	-148
PA4764	<i>fur</i>	TTTATTTGCCAGCCAAGATAGT	-60

Die Gene des *pchDCBA* Operons, wie auch die Regulatoren *fpvA* und *fptA* wurden gehören zu den von der *slyA* Überexpression PAO1 Δ *slyA* induzierten Genen und stehen unter der Kontrolle des bei Eisenmangel aktiven Repressors Fur. Für *fur*, welches selbst nicht differentiell reguliert vorlag, wurde eine SlyA Bindebox vorhergesagt. Sie liegt 60 bp entfernt vom Startcodon, was auf einen Repressor hindeutet. Weitere Bindeboxen konnten in *pvdP*, sowie in *pvdM* gefunden werden. Sie gehören zu den Genen der Pyoverdin Biosynthese, welche ebenfalls durch Fur reguliert werden. Die potentiellen Bindestellen von SlyA lagen bei *pvdP* 46 bp und bei *pvdM* 148 bp vom Startcodon entfernt. Um weitere Bindestellen von SlyA zu finden, und die *in silico* vorhergesagten Bindestellen zu bestätigen, wären *in vitro* Analysen wie Bandshift Untersuchungen sowie *in vitro* Footprint Analysen der vorhergesagten Bindestellen sinnvoll.

Insgesamt betrachtet deutet das Expressionsprofil von *P. aeruginosa* PAO1 Δ_{slyA} auf eine reprimierende Wirkung von SlyA auf Anr regulierte Gene hin. SlyA scheint ein übergeordneter Regulator in *P. aeruginosa* zu sein, welcher temperaturabhängige Regulation mit anaerobem Stoffwechsel verbindet. Ein solcher Zusammenhang ist bisher noch für keinen Vertreter der MarR Regulatoren in der Literatur beschrieben und sollte in weiteren Untersuchungen genauer betrachtet werden.

4 Zusammenfassung

Pseudomonas aeruginosa ist der dritthäufigste Keim, der in komplizierten Harnwegsinfektionen gefunden wird. Aufgrund seiner physiologischen Vielseitigkeit, Anpassungsfähigkeit und der hohen intrinsischen Resistenz gegenüber Antibiotika ist *P. aeruginosa* oftmals schwer zu bekämpfen. Ziel dieser Doktorarbeit war es, mit Hilfe eines Biofilm-Modells die Physiologie von *P. aeruginosa in vitro* unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen zu erforschen und dadurch die molekularen Grundlagen der Anpassung an das Wachstum im Harnweg zu bestimmen. Es wurde zu diesem Zweck ein artifizielles Urin Medium verwendet, wobei 1:10 verdünntes LB als Referenz diente.

Physiologische Daten in Kombination mit Transkriptomanalysen zeigten, dass *P. aeruginosa* PAO1 beim Wachstum mit AUM, sowohl aerob als auch anaerob im Vergleich zu 1:10 LB unter Eisenmangel leidet. Dieser führt über ein komplexes regulatorisches Netzwerk zur Erhöhung der Virulenz von *P. aeruginosa*. Weiterhin erfolgt eine massive Anpassung des Stoffwechsels an die Mangelbedingungen des Harnwegs.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss des Transkriptionsfaktors SlyA auf die Genexpression von *P. aeruginosa* PAO1 untersucht. Die Expression von *slyA* selbst unterliegt einer temperaturabhängigen Autoregulation. In Cytotoxizitätstests wurde deutlich, dass SlyA die Aktivität der Effektorproteine ExoS und ExoU steigert und zu verringerter Schwimm- und Schwärmaktivität führt. Eine SlyA Bindebox wurde für den Promotor des Gens des Eisenstoffwechsel-Repressors Fur vorhergesagt. Die Transkriptomanalysen zeigten, dass SlyA über Fur die Expression der Gene zur Eisenaufnahme induziert. Ein reprimierender Effekt von SlyA auf die Zielgene des Redoxregulators Anr wurde festgestellt. Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich bei SlyA um einen Repressor des anaeroben Metabolismus handelt.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass *P. aeruginosa* unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen auf eine komplexe Regulation zur Kompensierung des Eisenmangels und der Stoffwechselanpassung angewiesen ist. Ein Eingriff in diese Regulation könnte einen Ansatzpunkt für neue Strategien zur Bekämpfung von persistenten und chronischen Harnwegsinfektionen darstellen.

5 Ausblick

Für weiterführende Studien wäre eine Optimierung des Anzuchtssystems unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen sinnvoll. Beispielsweise wäre die Verwendung von humanem Urin als Nährmedium empfehlenswert, da so auch die unterschiedliche Zusammensetzung des Urins und die Auswirkung der einzelnen Komponenten auf das Verhalten von *P. aeruginosa* in Harnwegsinfektionen betrachtet werden kann. In weiteren Untersuchungen wäre die Anwendung eines Katheter-Biofilm-Anzuchtssystems hilfreich, um die Katheter-assoziierten Infektionen nachstellen zu können. Hier wäre ein Durchfluss des Katheters mit Urin zur Nährstoffversorgung angebracht, da durch den Fluss des Urins Scherkräfte auf den Biofilm wirken und diese die Festigkeit des Biofilms beeinflussen. Zusätzlich wäre ein Blasenmodell denkbar, da auch hier der Urin-Durchfluss realisiert werden könnte. In einem Mausmodell könnten nachfolgend die *in vitro* beobachteten Anpassungen von *P. aeruginosa* an den Harnweg unter *in vivo* Bedingungen beobachtet werden, da hier auch weitere Faktoren wie das Immunsystem des Wirtes Einfluss auf die Entwicklung der Infektion nehmen. Zudem wären die Untersuchungen wichtig, um über die spezifische Adaptation von *P. aeruginosa* neue Ziele für Antibiotika auszumachen. Diese weiterführenden Untersuchungen geben möglicherweise Aufschluss über neue Therapieansätze, mit denen chronisch kranken Patienten geholfen werden kann.

Die vergleichenden Untersuchungen der Referenzstämme *P. aeruginosa* PAO1 und PA14 ergab bezüglich der Aktivität der QS Systeme, sowie der Alginat-Produktion in AUM und 1:10 LB gegenteilige Ergebnisse. Hier wären vergleichende Transkriptom Untersuchungen zwischen *P. aeruginosa* PAO1 und PA14 sehr interessant, um Unterschiede in der Genregulation genau betrachten zu können. Möglicherweise ist der Grund für diese Abweichungen in der unterschiedlichen Gen-Ausstattung begründet. Bei *P. aeruginosa* PA14 scheint unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen das Las-System des QS verstärkt zu induziert zu sein. Hier wären quantitative Untersuchungen der produzierten RNAs und Effektorproteine sinnvoll, um den Zusammenhang des verstärkt induzierten LasRI QS-Systems und den induzierten Virulenzgenen zu untersuchen. Zudem wären weitere Analysen mit Harnwegsisolaten wichtig, um sowohl eine Stammspezifische, als auch eine Art-spezifische Auswertung der Anpassungsmechanismen an den Harnweg zu ermöglichen.

Um detailliertere Informationen über klinische *P. aeruginosa* Harnwegisolate zu erhalten, ist die Auswertung der sequenzierten Genome der *P. aeruginosa* Stämme MH27 und MH38 von großer Bedeutung. Hier könnte der Vergleich zwischen den bereits bekannten *P. aeruginosa* Genomen und den klinischen Isolaten Aufschluss geben, welche Genombereiche für eine Infektion von besonderer Wichtigkeit sind. Möglicherweise besitzen die Isolate in den Insertionen weitere Resistenzgene oder auch Gene, die die Anpassung von *P. aeruginosa* an infektionsrelevante Bedingungen erleichtern und *P. aeruginosa* so einen Vorteil bei der Etablierung solcher Infektionen verschaffen. Eine vergleichende Analyse mit Genomdatenbanken könnte hier Klarheit bringen.

Um die Funktion und die Zielgene von SlyA genauer zu untersuchen wären Transkriptom, Proteom und Metabolomanalysen mit *slyA* Deletionsmutanten in *P. aeruginosa* PAO1 sinnvoll. Die Transkriptomanalysen der *slyA* Überexpression in *P. aeruginosa* PAO1 lieferten vielfältige Hinweise darauf, dass es sich bei SlyA um einen Regulator des anaeroben Metabolismus handelt. Hier wären grundlegende Untersuchungen unter anaeroben Bedingungen sowohl mit einer *slyA* Deletionsmutante als auch mit der *slyA* Überexpression sinnvoll. Die Transkriptomanalyse der Überexpression von *slyA* zeigte eine Regulation mehrerer Zielgene des anaeroben transkriptionellen Regulators Anr. Da dieser Zusammenhang bislang noch nicht in der Literatur erwähnt wurde, wären hier weitere Untersuchungen wichtig, um eine solche Regulation zu bestätigen. Hier könnten qPCR Studien einen Hinweis auf den Einfluss von SlyA auf *anr* geben. Zudem wäre die Untersuchung von Anr regulierten Genen in einer *slyA* Deletionsmutante, sowie der *slyA* Überexpression über qPCR denkbar.

Für *in vitro* Charakterisierungen des SlyA Proteins ist die heterologe Produktion von SlyA denkbar. Das Vorhandensein des Proteins sollte in Western Blot Analysen zu unterschiedlichen Zeitpunkten und in unterschiedlichen Bedingungen betrachtet werden. Um weitere Zielgene zu identifizieren, sollten mit Hilfe des Überexpressionsstamms *P. aeruginosa* PAO1 Δ *slyA* unter anaeroben Bedingungen weitere Transkriptomanalysen durchgeführt werden. Die über *Virtual Footprint* vorhergesagten Protein-Protein-Interaktionen sollten mit Hilfe von Bandshift Assays und Footprint-Analysen *in vitro* überprüft werden.

Abbildungsverzeichnis

1	Darstellung des Harntrakts	2
2	Die 5 Phasen der Biofilmbildung Gram-negativer Bakterien	4
3	Kalibrierreihe für BCA-Test	31
4	Kalibrierung des PicoGreen® DNA Quantifizierungsnachweises	46
5	Wachstumskurve von <i>P. aeruginosa</i> PAO1, planktonisch	48
6	Aufbau des Anzuchtssystems für <i>P. aeruginosa</i> Koloniebiofilme	50
7	Koloniebiofilm-Wachstum von <i>P. aeruginosa</i> PAO1	51
8	Wachstumskurve abgeleitet von anaeroben Wachstumsexperimenten mit <i>P.aeruginosa</i> PAO1 Koloniebiofilmen	53
9	RNA Qualitätskontrolle mittels Bioanalyzer	55
10	Überlagerung der Verteilung der Genexpressionsstärken	56
11	Differentiell regulierte Gene von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 unter aeroben Bedingungen	57
12	Differentiell regulierte Gene von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 unter anaeroben Bedingungen	58
13	Regulatorisches Netzwerk der Eisenverwertung und der Alginatbildung von <i>P. aeruginosa</i> unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen im Biofilm .	66
14	Nachweis von QS Molekülen von <i>P. aeruginosa</i> über <i>E. coli</i> Reporter- stämmen	68
15	Protease und Lipase Aktivität in planktonischen, anaeroben Kulturen .	69
16	Alginat-Konzentration	70
17	Cytotoxizität von <i>P. aeruginosa</i> in AUM, 1:10 LB und LB	78
18	Wachstumskurven von vier klinischen <i>P. aeruginosa</i> Isolaten	79
19	Kollinearitätsprüfung	83
20	Beispielhafte Amplifikationskurve von <i>slyA</i> in <i>P. aeruginosa</i> PA14 . . .	86
21	Genexpression von <i>P. aeruginosa slyA</i> in Abhängigkeit zur Temperatur	87
22	Genstudie von (a): <i>exoS</i> in <i>P. aeruginosa</i> PAO1 und PAO1 Δ <i>slyA</i> (b): <i>exoU</i> in <i>P. aeruginosa</i> PA14 und PA14 Δ <i>slyA</i>	88
23	SlyA Bindebox-Motiv Sequenzlogo aus Prodoric	89

24	Temperatureinfluss auf die Cytotoxizität von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 und PA14	90
25	Cytotoxizitätstest von <i>P. aeruginosa</i> Stationärphase-Kulturen	93
26	Die drei unterschiedlichen Bewegungsformen von <i>P. aeruginosa</i>	95
27	Mobilität von <i>P. aeruginosa</i> PAO1, PA14, PAO1 \ddot{U}_{slyA} , PA14 \ddot{U}_{slyA}	95
28	Zusammenfassung differentiell regulierter Gene in <i>P. aeruginosa</i> PAO1 und PAO1 \ddot{U}_{slyA} , sowie deren funktionelle Gruppen	97

Tabellenverzeichnis

1	Verwendete Medien und ihre Zusammensetzung	15
2	Puffer und Lösungen	16
3	Beschreibung verwendeter <i>P. aeruginosa</i> Stämme	17
3	Fortsetzung: Beschreibung verwendeter <i>P. aeruginosa</i> Stämme	18
4	Weitere Stämme und Makrophagen	18
5	Verwendete Oligonukleotide	19
6	Verwendete Geräte, deren Modellbezeichnung nebst Hersteller und Fir- mensitz	20
7	M9 Medium (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	24
8	Zusammensetzung der Beweglichkeits-Testmedien	24
9	Virulenzfaktoren-Testmedien und ihre Zusammensetzung	25
10	<i>A. tumefaciens</i> Medien-Komponenten	26
11	Lösungen und Puffer für den Cytotoxizitätstest	28
12	Lösungen und Puffer für photometrische Enzymaktivitätstests	33
13	Zeitpunkte zur Ernte von RNA	36
14	Lösungen für die RNA Präparation	36
15	Lösungen für RNA Gelelektrophorese	38
16	cDNA Synthese	39
17	cDNA Programm	39
18	cDNA Fragmentierung	40
19	15 %iges Polyacrylamid Gel	41
20	qPCR Ansatz	41
21	qPCR Programm	42
22	Zusammensetzung: Lysis-Puffer	43
23	PCR Ansatz	43
24	PCR Programm	43
25	Puffer für die Plasmid-DNA-Minipräparation	44
26	Wuchsraten von <i>P. aeruginosa</i> PAO1	49
27	Ergebnisse der Transkriptomanalyse ausgewählter differentiell regulier- ter Gene beteiligt am Metabolismus von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 Kolonie- biofilmen unter aeroben Bedingungen	59

28	Differentiell exprimierte Gene, beteiligt am Metabolismus von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 unter anaeroben Harnwegs-ähnlichen Bedingungen, 37 °C, Koloniebiofilme, AUM-Agar oder 1:10 LB-Agar	61
29	Differentiell exprimierte Gene, beteiligt an der Physiologie von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen, 37 °C, Koloniebiofilme, AUM-Agar oder 1:10 LB-Agar	62
30	Differentiell exprimierte Gene von Transkriptionsregulatoren von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen, 37 °C, Koloniebiofilme, AUM-Agar oder 1:10 LB-Agar	64
31	Differentiell exprimierte Gene, beteiligt an der Regulation der Eisenaufnahme, sowie von Virulenzfaktoren von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen, 37 °C, Koloniebiofilme, AUM-Agar oder 1:10 LB-Agar	65
32	Serotypisierung von 31 uropathogenen <i>P. aeruginosa</i> Stämmen sowie den Referenzstämmen PAO1 und PA14.	72
33	Quorum Sensing-Aktivität der klinischen <i>P. aeruginosa</i> Harnwegs isolate	74
34	Cytotoxizität und Einteilung der klinischen Isolate	76
35	Charakterisierung der beiden sequenzierten <i>P. aeruginosa</i> CAUTI Isolate MH27 und MH38 im Vergleich.	81
36	Sequenzierungsergebnisse der <i>P. aeruginosa</i> CAUTI Isolate MH27 und MH38	82
37	Ergebnisse der Transkriptomanalyse ausgewählter induzierter Gene von PAO1 Ü_slyA	98
38	Ergebnisse der Transkriptomanalyse ausgewählter reprimierter Gene von PAO1 Ü_slyA	99
39	Bindeboxanalyse slyA	101
40	Induzierte Gene auf AUM vs. 1:10 LB, von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 Koloniebiofilmen unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen, anaerob	136
40	Fortsetzung: Induzierte Gene, anaerob	137
40	Fortsetzung: Induzierte Gene, anaerob	138
40	Fortsetzung: Induzierte Gene, anaerob	139
40	Fortsetzung: Induzierte Gene, anaerob	140
40	Fortsetzung: Induzierte Gene, anaerob	141
40	Fortsetzung: Induzierte Gene, anaerob	142

41	Reprimierte Gene von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 Koloniebiofilmen auf AUM vs. 1:10 LB, unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen, anaerob	142
41	Fortsetzung: Reprimierte Gene, anaerob	143
41	Fortsetzung: Reprimierte Gene, anaerob	144
41	Fortsetzung: Reprimierte Gene, anaerob	145
41	Fortsetzung: Reprimierte Gene, anaerob	146
41	Fortsetzung: Reprimierte Gene, anaerob	147
42	Induzierte Gene von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 Koloniebiofilmen auf AUM vs. 1:10 LB, unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen, aerob	148
42	Fortsetzung: Induzierte Gene, aerob	149
42	Fortsetzung: Induzierte Gene, aerob	150
43	Reprimierte Gene von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 Koloniebiofilmen auf AUM vs. 1:10 LB, unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen, aerob	150
43	Fortsetzung: Reprimierte Gene, aerob	151
43	Fortsetzung: Reprimierte Gene, aerob	152
44	Induzierte Gene von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 \ddot{U}_{slyA} , exponentielle Phase, LB, 25 °C, aerob	152
44	Fortsetzung: Induzierte Gene PAO1 \ddot{U}_{slyA}	153
45	Reprimierte Gene von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 \ddot{U}_{slyA} , exponentielle Pha- se, LB, 25 °C, aerob	153
45	Fortsetzung: Reprimierte Gene PAO1 \ddot{U}_{slyA}	154
45	Fortsetzung: Reprimierte Gene PAO1 \ddot{U}_{slyA}	155
45	Fortsetzung: Reprimierte Gene PAO1 \ddot{U}_{slyA}	156
45	Fortsetzung: Reprimierte Gene PAO1 \ddot{U}_{slyA}	157

Literaturverzeichnis

- JL. Adams und RJ. McLean. Impact of *rpoS* deletion on *Escherichia coli* biofilms. *Appl Environ Microbiol.*, 65:4285–7, 1999.
- B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts und P. Walter. *Molekularbiologie der Zelle*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim, 2004.
- AM. Albus, EC. Pesci, LJ. Runyen-Janecky, SE. West und BH. Iglewski. Vfr controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.*, 179:3928–35, 1997.
- MN. Alekshun, SB. Levy, TR. Mealy, BA. Seaton und JF. Head. The crystal structure of MarR, a regulator of multiple antibiotic resistance, at 2.3 Å resolution. *Nat Struct Biol.*, 8:710–4, 2001.
- J. N. Anderl, M. J. Franklin und P. S. Stewart. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to Ampicillin and Ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother.*, 44:1818–1824, 2000.
- H. Anwar, JL. Strap, K. Chen und JW. Costerton. Dynamic interactions of biofilms of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* with tobramycin and piperacillin. *Antimicrob Agents Chemother.*, 36:1208–14, 1992.
- H. Arai, Y. Igarashi und T. Kodama. Expression of the *nir* and *nor* genes for denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* requires a novel CRP/FNR-related transcriptional regulator, DNR, in addition to ANR. *FEBS Lett.*, 371:73–6, 1995.
- H. Arai, T. Kodama und Y. Igarashi. The role of the *nirQOP* genes in energy conservation during anaerobic growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 62:1995–9, 1998.
- AW. Asscher, M. Sussman, WE. Waters, RH. Davis und S. Chick. Urine as a medium for bacterial growth. *Lancet.*, 2:1037–41, 1966.
- DK. Augustin, Y. Song, MS. Baek, Y. Sawa, G. Singh, B. Taylor, A. Rubio-Mills, JL. Flanagan, JP. Wiener-Kronish und SV. Lynch. Presence or absence of lipopolysaccharide O antigens affects type III secretion by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.*, 189:2203–9, 2007.

- SA. Beatson, CB. Whitchurch, AB. Semmler und JS. Mattick. Quorum sensing is not required for twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.*, 184: 3598–604, 2002.
- B. Benkert, N. Quäck, K. Schreiber, L. Jaensch, D. Jahn und M. Schobert. Nitrate-responsive NarX-NarL represses arginine-mediated induction of the *Pseudomonas aeruginosa* arginine fermentation *arcDABC* operon. *Microbiology.*, 154:3053–60, 2008.
- T. Bjarnsholt, PO. Jensen, TB. Rasmussen, L. Christophersen, H. Calum, M. Hentzer, HP. Hougen, J. Rygaard, C. Moser, L. Eberland, N. Høiby und M. Givskov. Garlic blocks quorum sensing and promotes rapid clearing of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Microbiology*, 151:3873–3880, 2005.
- S. Bleves, C. Soscia, P. Nogueira-Orlandi, A. Lazdunski und A. Filloux. Quorum sensing negatively controls type III secretion regulon expression in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol.*, 187:3898–902, 2005.
- N. Blumenkrantz und G. Asboe-Hansen. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal Biochem.*, 54:484–9, 1973.
- GP. Bodey, R. Bolivar, V. Fainstein und L. Jadeja. Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis.*, 5:279–313, 1983.
- G. Borriello, E. Werner, F. Roe, A. M. Kim, G. D. Ehrlich und P. S. Stewart. Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.*, 48:2659–2664, 2004.
- G. Borriello, L. Richards, GD. Ehrlich und PS. Stewart. Arginine or nitrate enhances antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.*, 50(1):382–4, 2006.
- MJ. Bottomley, E. Muraglia, R. Bazzo und A. Carfi. Molecular insights into quorum sensing in the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* from the structure of the virulence regulator LasR bound to its autoinducer. *J Biol Chem.*, 282:13592–13600, 2007.
- H.-J. Brandes und W. Schönberger. *Anatomie und Physiologie für Krankenpflegeberufe sowie andere medizinische und pharmazeutische Fachberufe*. Urban & Fischer Verlag, 1995.

- A. Braud, M. Hannauer, GL. Mislin und IJ. Schalk. The *Pseudomonas aeruginosa* pyochelin-iron uptake pathway and its metal specificity. *J Bacteriol.*, 191:3517–25, 2009.
- BE. Britigan, GT. Rasmussen und CD. Cox. Augmentation of oxidant injury to human pulmonary epithelial cells by the *Pseudomonas aeruginosa* siderophore pyochelin. *Infect Immun.*, 65:1071–6, 1997.
- T. D. Brock, M. T. Madigan, J. M. Martinko und J. Parker. *Brock Mikrobiologie*. Spektrum Akademischer Verlag, 2003.
- T. Brooks und C. W. Keevil. A simple artificial urine for the growth of urinary pathogens. *Lett Appl Microbiol.*, 24:203–206, 1997.
- N. Buchmeier, S. Bossie, CY. Chen, FC. Fang, DG. Guiney und SJ. Libby. SlyA, a transcriptional regulator of *Salmonella typhimurium*, is required for resistance to oxidative stress and is expressed in the intracellular environment of macrophages. *Infect Immun.*, 65:3725–30, 1997.
- W. G. Characklis. *Biofilms*. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1990.
- V. Chepuri, L. Lemieux, DC. Au und RB. Gennis. The sequence of the *cyo* operon indicates substantial structural similarities between the cytochrome o ubiquinol oxidase of *Escherichia coli* and the aa3-type family of cytochrome c oxidases. *J Biol Chem.*, 265:11185–92, 1990.
- D. Corbett, HJ. Bennett, H. Askar, J. Green und IS. Roberts. SlyA and H-NS regulate transcription of the *Escherichia coli* K5 capsule gene cluster, and expression of *slyA* in *Escherichia coli* is temperature-dependent, positively autoregulated, and independent of H-NS. *J Biol Chem.*, 282:33326–35, 2007.
- P. Cornelis. Iron uptake and metabolism in *pseudomonads*. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 86:1637–45, 2010.
- P. Cornelis, S. Matthijs und L. Van Oeffelen. Iron uptake regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biometals.*, 22:15–22, 2009.
- JW. Costerton, PS. Stewart und EP. Greenberg. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284:1318–22, 1999.
- CD. Cox und P. Adams. Siderophore activity of pyoverdine for *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun.*, 48:130–8, 1985.

- D. Dacheux, J. Goure, J. Chabert, Y. Usson und I. Attree. Pore-forming activity of type III system-secreted proteins leads to oncosis of *Pseudomonas aeruginosa*-infected macrophages. *Mol Microbiol.*, 40:76–85, 2001.
- JJ. Daniels, IB. Autenrieth, A. Ludwig und W.Goebel. The gene *slyA* of *Salmonella typhimurium* is required for destruction of M cells and intracellular survival but not for invasion or colonization of the murine small intestine. *Infect Immun.*, 64:5075–84, 1996.
- AC. Darling, B. Mau, FR. Blattner und NT. Perna. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Res.*, 14:1394–403, 2004.
- SP. Diggle, P. Cornelis, P. Williams und M. Cámara. 4-quinolone signalling in *Pseudomonas aeruginosa*: old molecules, new perspectives. *Int J Med Microbiol.*, 296: 83–91, 2006.
- M. Dlugaszek, M. Kaszczuk und M. Mularczyk-Oliwa. Magnesium, calcium, and trace element excretion in 24-h urine. *Biol Trace Elem Res.*, 137:1–10, 2010.
- RG. Doggett, GM. Harrison und RE. Carter. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in patients with chronic illness. *Lancet I*, 1:236–237, 1977.
- RM. Donlan und JW. Costerton. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.*, 15:167–93, 2002.
- G. Döring. Die Bedeutung der Virulenzfaktoren von *Pseudomonas aeruginosa* für akute und chronische *Pseudomonas aeruginosa*- Infektionen. *Infection*, 1:47–50, 1987.
- JA. Driscoll, SL. Brody und MH. Kollef. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs*, 67:351–368, 2007.
- K. Duan und MG. Surette. Environmental regulation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Las and Rhl quorum-sensing systems. *J Bacteriol.*, 189:4827–36, 2007.
- E. Déziel, Y. Comeau und R. Villemur. Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities. *J Bacteriol.*, 183:1195–204, 2001.

- J. Egberts und W. Soederhuizen. Urine samples before dinner are preferable when studying changes in endogenous nitrate production under uncontrolled dietary conditions. *Clinica Chimica Acta*, 254:141–148, 1996.
- DW. Ellison und VL. Miller. Regulation of virulence by members of the MarR/SlyA family. *Curr Opin Microbiol.*, 9:153–9, 2006.
- J. Engel und P. Balachandran. Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Curr Opin Microbiol.*, 12:61–6, 2009.
- N. Entner und M. Doudoroff. Glucose and gluconic acid oxidation of *Pseudomonas saccharophila*. *J Biol Chem.*, 196:853–62, 1952.
- M. Eschbach, K. Schreiber, K. Trunk, J. Buer, D. Jahn und M. Schobert. Long-term anaerobic survival of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* via pyrovate fermentation. *J Bacteriol.*, 186:4596–4604, 2004.
- DJ. Evans, DW. Frank, V. Finck-Barbancon, C. Wu und SMJ. Fleiszig. *Pseudomonas aeruginosa* invasion and cytotoxicity are independent events, both of which involve protein tyrosine kinase activity. *Infect Immun.*, 66:1453–1459, 1998.
- E. Fass und EA. Groisman. Control of *Salmonella* pathogenicity island-2 gene expression. *Curr Opin Microbiol.*, 12:199–204, 2009.
- H. Feltman, G. Schulert, S. Khan, M. Jain, L. Peterson und AR. Hauser. Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology.*, 147:2659–69, 2001.
- A. Filloux, M. Bally, C. Soscia, M. Murgier und A. Lazdunski. Phosphate regulation in *Pseudomonas aeruginosa*: cloning of the alkaline phosphatase gene and identification of *phoB*- and *phoR*-like genes. *Mol Gen Genet.*, 212:510–3, 1988.
- A. Filloux, A. Hachani und S. Bleves. The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology.*, 154:1570–83, 2008.
- V. Finck-Barbançon, TL. Yahr und DW. Frank. Identification and characterization of SpcU, a chaperone required for efficient secretion of the ExoU cytotoxin. *J Bacteriol.*, 180:6224–31, 1998.

- SM. Fleiszig, JP. Wiener-Kronish, H. Miyazaki, V. Vallas, KE. Mostov, D. Kanada, T. Sawa, TS. Yen und DW. Frank. *Pseudomonas aeruginosa*-mediated cytotoxicity and invasion correlate with distinct genotypes at the loci encoding exoenzyme S. *Infect Immun.*, 65:579–86, 1997.
- DE. Fouts, RB. Abramovitch, JR. Alfano, AM. Baldo and CR. Buell, S. Cartinhour, AK. Chatterjee, M. D’Ascenzo, ML. Gwinn, SG. Lazarowitz, NC. Lin, GB. Martin, AH. Rehm, DJ. Schneider, K. van Dijk, X. Tang und A. Collmer. Genomewide identification of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 promoters controlled by the HrpL alternative sigma factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 99:2275–80, 2002.
- DW. Frank. The exoenzyme S regulon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.*, 26:621–9, 1997.
- KS. Fröhlich und J. Vogel. Activation of gene expression by small RNA. *Curr Opin Microbiol.*, 12:674–82, 2009.
- L. Friedman und R. Kolter. Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *J Bacteriol.*, 186:4457–65, 2004a.
- L. Friedman und R. Kolter. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Mol Microbiol.*, 51:675–90, 2004b.
- E. Frimmersdorf, S. Horatzek, A. Pelnikevich, L. Wiehlmann und D. Schomburg. How *Pseudomonas aeruginosa* adapts to various environments: a metabolomic approach. *Environ Microbiol.*, 12:1734–47, 2010.
- C. Fuqua und SC. Winans. Conserved cis-acting promoter elements are required for density-dependent transcription of *Agrobacterium tumefaciens* conjugal transfer genes. *J Bacteriol.*, 178:435–440, Jan 1996.
- CA. Fux, S. Wilson und P. Stoodley. Detachment characteristics and oxacillin resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm emboli in an *in vitro* catheter infection model. *J Bacteriol.*, 186:4486–91, 2004.
- JM. Ghigo. Are there biofilm-specific physiological pathways beyond a reasonable doubt? *Res Microbiol.*, 154:1–8, 2003.

- X. Giannakopoulos, A. Evangelou, V. Kalfakakou, E. Grammeniatis, I. Papandropoulos und K. Charalambopoulos. Human bladder urine oxygen content: implications for urinary tract diseases. *Int Urol Nephrol.*, 29:393–401, 1997.
- G. L. Gilardi. Characterization of EO-1 strains (*Pseudomonas kingii*) isolated from clinical specimens and the hospital environment. *Appl Microbiol.*, 21:414–419, 1970.
- UM. Goehring, G. Schmidt, KJ. Pederson und K. Aktoriesand JT. Barbieri. The N-terminal domain of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S is a GTPase-activating protein for Rho GTPases. *J Biol Chem.*, 274:36369–72, 1999.
- WJ. Gooderham und RE. Hancock. Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev.*, 33:279–94, 2009.
- CA. Gordon, NA. Hodges und C. Marriott. Antibiotic interaction and diffusion through alginate and exopolysaccharide of cystic fibrosis-derived *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.*, 22:667–74, 1988.
- JR. Govan und V. Deretic. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: Muroid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev.*, 60:539–574, 1996.
- JRW. Govan. *Characteristics of muroid Pseudomonas aeruginosa in vitro and in vivo*. In: *Pseudomonas infection and alginates*. Chapman and Hall, London, New York, 1990.
- J. Greenwald, G. Zeder-Lutz, A. Hagege, H. Celia und F. Pattus. The metal dependence of pyoverdine interactions with its outer membrane receptor FpvA. *J Bacteriol.*, 190: 6548–58, 2008.
- UH. Ha, J. Kim, H. Badrane, J. Jia, HV. Baker, D. Wu und S. Jin. An in vivo inducible gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes an anti-ExsA to suppress the type III secretion system. *Mol Microbiol.*, 54:307–20, 2004.
- L. Hall-Stoodley und P. Stoodley. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol.*, 11:1034–43, Jul 2009.
- D. Hanahan. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.*, 166:557–80, 1983.

- RE. Hancock, LM. Mutharia and L. Chan, RP. Darveau, DP. Speert und GB. Pier. *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis: a class of serum-sensitive, nontypable strains deficient in lipopolysaccharide O side chains. *Infect Immun.*, 42:170–7, 1983.
- AR. Hauser. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol.*, 7:654–65, 2009.
- M. Hentzer, H. Wu, JB. Andersen, K. Riedel, TB. Rasmussen, N. Bagge and N. Kumar, MA. Schembri, Z. Song and P. Kristoffersen, M. Manefield and JW. Costerton, S. Molin, L. Eberl, P. Steinberg, S. Kjelleberg, N. Høiby und M. Givskov. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO J.*, 22:3803–3815, 2003.
- AK. Heroven, G. Nagel, HJ. Tran, S. Parr und P. Dersch. RovA is autoregulated and antagonizes H-NS-mediated silencing of invasin and *rovA* expression in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol Microbiol.*, 53:871–88, 2004.
- M. Hogardt, M. Roeder, AM. Schreff, L. Eberl und J. Heesemann. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* *exoS* is controlled by quorum sensing and RpoS. *Microbiology.*, 150:843–51, 2004.
- M. Hogardt, C. Hoboth, S. Schmoldt, C. Henke, L. Bader und J. Heesemann. Stage-specific adaptation of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* isolates during chronic pulmonary infection in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis.* 2007, 195:70–80, 2007.
- BW. Holloway. Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol.*, 13:572–81, 1955.
- BW. Holloway, V. Krishnapillai und AF. Morgan. Chromosomal genetics of *Pseudomonas*. *Microbiol Rev.*, 43:73–102, 1979.
- S. Häussler, I. Ziegler, A. Löttel, F. von Götz, M. Rohde, D. Wehmhöner, S. Saravanamuthu, B. Tümmler und I. Steinmetz. Highly adherent small-colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *J Med Microbiol.*, 52:295–301, 2003.
- F. Imperi, F. Tiburzi und P. Visca. Molecular basis of pyoverdine siderophore recycling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 106:20440–5, 2009.

- S. Ingavale, W. van Wamel, TT. Luong, CY. Lee und AL. Cheung. Rat/MgrA, a regulator of autolysis, is a regulator of virulence genes in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.*, 73:1423–31, 2005.
- T. Jahns. Regulation of urea uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antonie Van Leeuwenhoek.*, 62:173–9, 1992.
- S. Jain und D. E. Ohman. *Alginate biosynthesis. In: Pseudomonas, biosynthesis of macromolecules and molecular mechanism*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2004.
- GL. Jones, CT. Muller, M. O´Reilly und DJ. Stickler. Effect of triclosan on the development of bacterial biofilms by urinary tract pathogens on urinary catheters. *J Antimicrob Chemother.*, 57:266–272, 2006.
- TL. Jones-Lepp. Chemical markers of human waste contamination: analysis of urobilin and pharmaceuticals in source waters. *J Environ Monit.*, 8:472–8, 2006.
- T. Kawakami, M. Kuroki, M. Ishii, Y. Igarashi und H. Arai. Differential expression of multiple terminal oxidases for aerobic respiration in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol.*, 12:1399–412, 2010.
- BI. Kazmierczak und JN. Engel. *Pseudomonas aeruginosa* ExoT acts in vivo as a GTPase-activating protein for RhoA, Rac1, and Cdc42. *Infect Immun.*, 70:2198–205, 2002.
- T. Köhler, LK. Curty, F. Barja, C. van Delden und JC. Pechère. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J Bacteriol.*, 182:5990–6, 2000.
- A. Kilmartin. *Blasenentzündung: Anleitung zur Selbsthilfe. Die richtige Diagnose. Antworten auf Patientenfragen. Das Selbsthilfe-Sofortprogramm*. Trias, Auflage: 2. A., 2002.
- E. Kintz und JB. Goldberg. Regulation of lipopolysaccharide O antigen expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Future Microbiology*, 3(3):191–203, April 2008.
- DA. Knight, V. Finck-Barbançon, SM. Kulich und JT. Barbieri. Functional domains of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S. *Infect Immun.*, 63:3182–6, 1995.

- YA. Knirel, OV. Bystrova, AS. Shashkov, B. Lindner, NA. Kocharova, SN. Senchenkova, H. Moll, U. Zähringer, K. Hatano und GB. Pier. Structural analysis of the lipopolysaccharide core of a rough, cystic fibrosis isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Biochem.*, 268:4708–19, 2001.
- ME. Kovach, RW. Phillips, PH. Elzer, RM. Roop 2nd und KM. Peterson. pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques.*, 16:800–2, 1994.
- G. Kovacikova, W. Lin und K. Skorupski. *Vibrio cholerae* AphA uses a novel mechanism for virulence gene activation that involves interaction with the LysR-type regulator AphB at the tcpPH promoter. *Mol Microbiol.*, 53:129–42, 2004.
- R. Krall, G. Schmidt, K. Aktories und JT. Barbieri. *Pseudomonas aeruginosa* ExoT is a Rho GTPase-activating protein. *Infect Immun.*, 68:6066–8, 2000.
- U. Kretzschmar, M. Schobert und H. Görisch. The *Pseudomonas aeruginosa acsA* gene, encoding an acetyl-CoA synthetase, is essential for growth on ethanol. *Microbiology.*, 147:2671–7, 2001.
- U. Kretzschmar, V. Khodaverdi und L. Adrian. Transcriptional regulation of the acetyl-CoA synthetase gene *acsA* in *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch Microbiol.*, 192:685–90, 2010.
- R. Krieger, A. Rompf, M. Schobert und D. Jahn. The *Pseudomonas aeruginosa hemA* promoter is regulated by Anr, Dnr, NarL and Integration Host Factor. *Mol Genet Genomics.*, 267:409–17, 2002.
- JJ. Kukor, RH. Olsen und DP. Ballou. Cloning and expression of the *catA* and *catBC* gene clusters from *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *J Bacteriol.*, 170:4458–65, 1988.
- A. Kuroda, T. Kumano, K. Taguchi, T. Nikata, J. Kato und H. Ohtake. Molecular cloning and characterization of a chemotactic transducer gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.*, 177:7019–25, 1995.
- DH. Kwon und CD. Lu. Polyamine effects on antibiotic susceptibility in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.*, 51:2070–2077, 2007.
- DH. Kwon und CD. Lu. Polyamines induce resistance to cationic peptide, aminoglycoside and quinolone antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Antimicrob Agents Chemother.*, 50:1615–1622, 2006.

- P. A. Lambert. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J R Soc Med.*, 95:22–26, 2002.
- A. Latifi, M. Foglino, K. Tanaka, P. Williams und A. Lazdunski. A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Mol Microbiol.*, 21:1137–46, 1996.
- GW. Lau, DJ. Hassett, H. Ran und F. Kong. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol Med.*, 10:599–606, 2004.
- GE. Lees, CA. Osborne und JB. Stevens. Urine: a medium for bacterial growth. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.*, 9:611–6, 1980.
- JG. Leid, CJ. Willson, ME. Shirtliff, DJ. Hassett, MR. Parsek und AK. Jeffers. The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN- γ -mediated macrophage killing. *J Immunol.*, 175:7512–7518, 2005.
- TG. Lessie und FC. Neidhardt. Formation and operation of the histidine-degrading pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.*, 93:1800–10, 1967.
- TG. Lessie und PV. Phibbs Jr. Alternative pathways of carbohydrate utilization in *pseudomonads*. *Annu Rev Microbiol.*, 38:359–88, 1984.
- K. Lewis. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother.*, 45:999–1007, 2001.
- H. Liang, L. Li, W. Kong, L. Shen und K. Duan. Identification of a novel regulator of the quorum-sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett.*, 293:196–204, 2009.
- SJ. Libby, W. Goebel, A. Ludwig, N. Buchmeier, F. Bowe, FC. Fang, DG. Guiney, JG. Songer und F. Heffron. A cytolysin encoded by *Salmonella* is required for survival within macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 91:489–93, 1994.
- D. Lim, K. Poole und NC. Strynadka. Crystal structure of the MexR repressor of the *mexRAB-oprM* multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem.*, 277:29253–9, 2002.
- SA. Linehan, A. Rytkönen, XJ. Yu, M. Liu und DW. Holden. SlyA regulates function of *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI-2) and expression of SPI-2-associated genes. *Infect Immun.*, 73:4354–62, 2005.

- PV. Liu und S. Wang. Three new major somatic antigens of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol.*, 28:922–5, 1990.
- PV. Liu, H. Matsumoto, H. Kusama und T. Bergan. Survey of heat-stable, major somatic antigens of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Syst Bacteriol*, 33:256–264, 1983.
- S. Lory, M. Wolfgang, V. Lee und R. Smith. The multi-talented bacterial adenylate cyclases. *Int J Med Microbiol.*, 293:479–82, 2004.
- Q. Ma, Y. Zhai, JC. Schneider und TM. Ramseier MH. Saier Jr. Protein secretion systems of *Pseudomonas aeruginosa* and *P. fluorescens*. *Biochim Biophys Acta.*, 1611:223–33, 2003.
- TF. Mah und GA. O ´Toole. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, 9:34–39, 2001.
- S. Mann. Über den Geruchsstoff von *Pseudomonas aeruginosa*. *Archives of Microbiology*, 54:184–190, 1966.
- AK. Marr, J. Overhage, M. Bains und RE. Hancock. The Lon protease of *Pseudomonas aeruginosa* is induced by aminoglycosides and is involved in biofilm formation and motility. *Microbiology*, 153:474–482, 2007.
- E. Matsumura, M. Sakai, K. Hayashi, S. Murakami, S. Takenaka und K. Aoki. Constitutive expression of *catABC* genes in the aniline-assimilating bacterium *Rhodococcus* species AN-22: production, purification, characterization and gene analysis of CatA, CatB and CatC. *Biochem J.*, 393:219–26, 2006.
- JS. Mattick. Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol.*, 56:289–314, 2002.
- SL. McKnight, BH. Iglewski und EC. Pesci. The *Pseudomonas* quinolone signal regulates *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.*, 182:2702–8, 2000.
- L. Meile und L. Soldatiand T. Leisinger. Regulation of proline catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Arch Microbiol.*, 132:189–93, 1982.
- JH. Merrit, DE. Kadouri und GA. O´Toole. *Current Protocols in Microbiology 1B.1.1-1B.1.17*. John Wiley & Sons, Inc., 2005.

- JM. Meyer und J. Hornspreger. Role of pyoverdine_{Pf}, the iron binding fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens* iron transport. *J. Gen. Microbiol.*, 107:329–331, 1978.
- L. Michel, A. Bachelard und C. Reimmann. Ferripyochelin uptake genes are involved in pyochelin-mediated signalling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology.*, 153:1508–18, 2007.
- R. Mittal, RK. Khandwaha, V. Gupta, PK. Mittal und K. Harjai. Phenotypic characters of urinary isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and their association with mouse renal colonization. *Indian J Med Res.*, 123:67–72, 2006.
- R. Mittal, S. Sharma, S. Chhibber und K. Harjai. Iron dictates the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in urinary tract infections. *J Biomed Sci.*, 15:731–41, 2008.
- R. Mittal, S. Sharma, S. Chhibber, S. Aggarwal, V. Gupta und K. Harjai. Correlation between serogroup, in vitro biofilm formation and elaboration of virulence factors by uropathogenic *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Immunol Med Microbiol.*, 58:237–43, 2010.
- R. Münch, K. Hiller, A. Grote, M. Scheer, J. Klein, M. Schobert und D. Jahn. Virtual Footprint and PRODORIC: an integrative framework for regulon prediction in prokaryotes. *Bioinformatics.*, 21:4187–9, 2005.
- KN. Moore, RA. Day und M. Albers. Pathogenesis of urinary tract infections: a review. *J Clin Nurs.*, 11:568–74, 2002.
- GG. More, RE. Gerner und HA. Franklin. Culture of normal human leukocytes. *JAMA*, 199:519–24, 1967.
- LA. Morici, AJ. Carterson, VE. Wagner, A. Frisk, JR. Schurr, K. Höner zu Bentrup, DJ. Hassett, BH. Iglewski, K. Sauer und MJ. Schurr. *Pseudomonas aeruginosa* AlgR represses the Rhl quorum-sensing system in a biofilm-specific manner. *J Bacteriol.*, 189:7752–64, 2007.
- T. Mosmann. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.*, 65:55–63, 1983.
- G. Nagel, A. Lahrz und P. Dersch. Environmental control of invasin expression in *Yersinia pseudotuberculosis* is mediated by regulation of RovA, a transcriptional activator of the SlyA/Hor family. *Mol Microbiol.*, 41:1249–69, 2001.

- WW. Navarre, TA. Halsey, D. Walthers, J. Frye, M. McClelland, JL. Potter, LJ. Kenney, JS. Gunn, FC. Fang und SJ. Libby. Co-regulation of *Salmonella enterica* genes required for virulence and resistance to antimicrobial peptides by SlyA and PhoP/-PhoQ. *Mol Microbiol.*, 56:492–508, 2005.
- F. H. Netter und E. Renner. *Farbatlant der Medizin Bd.2, Niere und Harnwege*. Thieme, Stuttgart, 1983.
- JC. Nickel, I. Ruseska, JB. Wright und JW. Costerton. Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrob Agents Chemother.*, 27:619–624, 1985.
- JC. Nickel, J. Downey und JW. Costerton. Movement of *Pseudomonas aeruginosa* along catheter surfaces. A mechanism in pathogenesis of catheter-associated infection. *Urology.*, 39:93–98, 1992.
- T. Nikata, Y. Sakai, K. Shibata, J. Kato, A. Kuroda und H. Ohtake. Molecular analysis of the phosphate-specific transport (*pst*) operon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Gen Genet.*, 250:692–8, 1996.
- VA. Norte, MR. Stapleton und J. Green. PhoP-responsive expression of the *Salmonella enterica* serovar typhimurium *slyA* gene. *J Bacteriol.*, 185:3508–14, 2003.
- HJ. Obernesser, G. Döring und K. Botzenhart. Extrazelluläre Toxine von *Pseudomonas aeruginosa*. I. Reinigung und Charakterisierung zweier Exoproteasen. *Zentralbl Bakteriologie A.*, 249:76–88, 1981.
- MD. Obritsch, DN. Fish, R. MacLaren und R. Jung. Nosocomial infections due to multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology and treatment options. *Pharmacotherapy*, 25:1353–1364, 2005.
- UA. Ochsner, Z. Johnson und ML. Vasil. Genetics and regulation of two distinct haem-uptake systems, *phu* and *has*, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology.*, 146:185–98, 2000.
- UA. Ochsner, PJ. Wilderman, AI. Vasil und ML. Vasil. Gene chip expression analysis of the iron starvation response in *Pseudomonas aeruginosa*: identification of novel pyoverdine biosynthesis genes. *Mol Microbiol.*, 45:1277–87, 2002.

- RM. Ostroff, AI. Vasil und ML. Vasil. Molecular comparison of a nonhemolytic and a hemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.*, 172:5915–5923, 1990.
- GA. O'Toole und R. Kolter. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol.*, 30:295–304, 1998.
- A. Pastor, J. Chabert, M. Louwagie, J. Garin und I. Attree. PscF is a major component of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion needle. *FEMS Microbiol Lett.*, 253:95–101, 2005.
- JP. Pearson, KM. Gray, L. Passador, KD. Tucker, A. Eberhard, BH. Iglewski und EP. Greenberg. Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 91:197–201, 1994.
- EC. Pesci und BH. Iglewski. *Quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa*. In: *Cell-cell signaling in bacteria*. ASM Press, Washington, D. C., 1999.
- L. Petruschka, K. Adolf, G. Burchhardt, J. Dervede, J. Jürgensen und H. Herrmann. Analysis of the *zwf-pgl-eda*-operon in *Pseudomonas putida* strains H and KT2440. *FEMS Microbiol Lett.*, 215:89–95, 2002.
- I. Phillips. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* in the clinical laboratory. *J Med Microbiol.*, 1:9–16, 1969.
- GB. Pier, F. Coleman, M. Grout, M. Franklin und DE. Ohman. Role of alginate O acetylation in resistance of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to opsonic phagocytosis. *Infect. Immun.*, 69:1895–1901, 2001.
- MC. Plotkowski, HC. Póvoa, JM. Zahm, G. Lizard, GM. Pereira, JM. Tournier und E. Puchelle. Early mitochondrial dysfunction, superoxide anion production, and DNA degradation are associated with non-apoptotic death of human airway epithelial cells induced by *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 26:617–626, 2002.
- K. Poole, S. Neshat, K. Krebs und DE. Heinrichs. Cloning and nucleotide sequence analysis of the ferripyoverdine receptor gene *fpuA* of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.*, 175:4597–604, 1993.

- O. Preisig, D. Anthamatten und H. Hennecke. Genes for a microaerobically induced oxidase complex in *Bradyrhizobium japonicum* are essential for a nitrogen-fixing endosymbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 90:3309–13, 1993.
- L. Prestidge, V. Gage und J. Spizizen. Protease activities during the course of sporulation on *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.*, 107:815–23, 1971.
- Pschyrembel. *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*. de Gruyter, 2004.
- LG. Rahme, EJ. Stevens, SF. Wolfort, J. Shao, RG. Tompkins und FM. Ausubel. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science*, 268:1899–902, 1995.
- J.-L. Ramos und RC. Levesque. *Pseudomonas: Molecular biology of emerging issues*. Springer, Berlin; Auflage: 1, 2006.
- MH. Rashid und A. Kornberg. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 97:4885–90, 2000.
- TB. Rasmussen, T. Bjarnsholt, ME. Skindersoe, M. Hentzer, P. Kristoffersen, M. Kôte, J. Nielsen, L. Eberl und M. Givskov. Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. *J Bacteriol.*, 187:1799–1814, 2005.
- B. H. Rehm und U. K. Winkler. *Alginatebiosynthese bei P. aeruginosa und A. vinelandii: Molekularbiologie und Bedeutung*, volume 2. Biospektrum, 1996.
- G. Reid, R. Charbonneau-Smith, D. Lam, YS. Kang, M. Lacerte und KC. Hayes. Bacterial biofilm formation in the urinary bladder of spinal coord injured patients. *Paraplegia*, 30:711–7, 1992.
- PA. Revell und VL. Miller. A chromosomally encoded regulator is required for expression of the *Yersinia enterocolitica inv* gene and for virulence. *Mol Microbiol.*, 35: 677–85, 2000.
- S. Reverchon, W. Nasser und J. Robert-Baudouy. *pecS*: a locus controlling pectinase, cellulase and blue pigment production in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol Microbiol.*, 11: 1127–39, 1994.
- M. Rivera und EJ. McGroarty. Analysis of a common-antigen lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.*, 171:2244–8, 1989.

- A. Rompf, C. Hungerer, T. Hoffmann, M. Lindenmeyer, U. Römling, U. Gross, MO. Doss, H. Arai, Y. Igarashi und D. Jahn. Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* *hemF* and *hemN* by the dual action of the redox response regulators Anr and Dnr. *Mol Microbiol.*, 29:985–97, 1998.
- A. Ronald. The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. *Am J Med.*, 113:Suppl 1A:14S–19S, 2002.
- C. Rouanet, K. Nomura, S. Tsuyumu und W. Nasser. Regulation of *pelD* and *pelE*, encoding major alkaline pectate lyases in *Erwinia chrysanthemi*: involvement of the main transcriptional factors. *J Bacteriol.*, 181:5948–57, 1999.
- D. Roy, DR. Liston, VJ. Idone, A. Di, DJ. Nelson, C. Pujol, JB. Bliska, S. Chakrabarti und NW. Andrews. A process for controlling intracellular bacterial infections induced by membrane injury. *Science*, 304:1515–8, 2004.
- C. Ryder, M. Byrd und DJ. Wozniak. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Curr Opin Microbiol.*, 10:644–8, 2007.
- RT. Sadikot, TS. Blackwell, JW. Christman und AS. Prince. Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.*, 171:1209–1223, 2005.
- J. Sambrook und D. Russell. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- J. Sambrook, EF. Fritsch und T. Maniatis. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989.
- H. Sarre. Untersuchungen über die Sauerstoff- und Kohlensäurespannung im Harn und ihre Beziehung zum Nierengewebe und zur Funktion. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 239:377–399, 1938.
- JA. Schaber, NL. Carty, NA. McDonald, ED. Graham, R. Cheluvappa, JA. Griswold und AN. Hamood. Analysis of quorum sensing deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol.*, 53:841–853, 2004.
- JA. Schaber, A. Hammond, NL. Carty, SC. Williams, JA. Colmer-Hamood, BH. Burrowes, V. Dhevan, JA. Griswold und AN. Hamood. Diversity of biofilms produced by quorum-sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol.*, 56:738–748, 2007a.

- JA. Schaber, WJ. Triffo, SJ. Suh, JW. Oliver, MC. Hastert, JA. Griswold, M. Auer, AN. Hamood und KP. Rumbaugh. *Pseudomonas aeruginosa* forms biofilms in acute infection independent of cell-to-cell signaling. *Infect Immun.*, 75:3715–21, 2007b.
- JW. Schertzer, SA. Brown und M. Whiteley. Oxygen levels rapidly modulate *Pseudomonas aeruginosa* social behaviours via substrate limitation of PqsH. *Mol Microbiol.*, 77:1527–38, 2010.
- M. Schobert. *Molekulargenetische Untersuchungen zum Ethanol-oxidierenden System in Pseudomonas aeruginosa*. PhD thesis, Technische Universität Berlin, 1999.
- M. Schobert und P. Tielen. Contribution of oxygen-limiting conditions to persistent infection of *Pseudomonas aeruginosa*. *Future Microbiol.*, 5:603–21, 2010.
- K. Schreiber, N. Boes, M. Eschbach, L. Jaensch, J. Wehland, T. Bjarnsholt, M. Givskov, M. Hentzer und M. Schobert. Anaerobic survival of *Pseudomonas aeruginosa* by pyruvate fermentation requires an Usp-type stress protein. *J Bacteriol.*, 188: 659–68, 2006.
- K. Schreiber, R. Krieger, B. Benkert, M. Eschbach, H. Arai, M. Schobert und D. Jahn. The anaerobic regulatory network required for *Pseudomonas aeruginosa* nitrate respiration. *J Bacteriol.*, 189:4310–4314, 2007.
- GS. Schulert, H. Feltman, SD. Rabin, CG. Martin, SE. Battle, J. Rello und AR. Hauser. Secretion of the toxin ExoU is a marker for highly virulent *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from patients with hospital-acquired pneumonia. *J Infect Dis.*, 188:1695–706, 2003.
- S. Schulte. *Wirksamkeit von Wasserstoffperoxid gegenüber Bakterien*. PhD thesis, Universität Duisburg-Essen, Standort Duisburg, 2003.
- MJ. Schurr, H. Yu, JM. Martinez-Salazar, JC. Boucher und V. Deretic. Control of AlgU, a member of the sigma E-like family of stress sigma factors, by the negative regulators MucA and MucB and *Pseudomonas aeruginosa* conversion to mucoidy in cystic fibrosis. *J Bacteriol.*, 178:4997–5004, 1996.
- M. Schuster, CP. Lostroh, T. Ogi und EP. Greenberg. Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J Bacteriol.*, 185:2066–79, 2003.

- S. Schwarzmann und J. R. Boring. Antiphagocytic effect of slime from mucoid strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun.*, 3:762–767, 1971.
- D. Shah, Z. Zhang, A. Khodursky, N. Kaldalu, K. Kurg und K. Lewis. Persisters: a distinct physiological state of *E. coli*. *BMC Microbiol.*, 12:6:53, 2006.
- GH. Shand, H. Anwar, J. Kadurugamuwa, MR. Brown, SH. Silverman und J. Melling. In vivo evidence that bacteria in urinary tract infection grow under iron-restricted conditions. *Infect Immun.*, 48:35–9, 1985.
- DK. Shen, D. Filopon, L. Kuhn, B. Polack und B. Toussaint. PsrA is a positive transcriptional regulator of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun.*, 74:1121–9, 2006.
- DK. Shen, L. Quenee, M. Bonnet, L. Kuhn, M. Derouazi, D. Lamotte, B. Toussaint und B. Polack. Orf1/SpcS chaperones ExoS for type three secretion by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biomed Environ Sci.*, 21:103–9, 2008.
- Y. Shi, T. Latifi, MJ. Cromie und EA. Groisman. Transcriptional control of the antimicrobial peptide resistance *ugtL* gene by the *Salmonella* PhoP and SlyA regulatory proteins. *J Biol Chem.*, 279:38618–25, 2004.
- K. Shigemura, S. Arakawa, Y. Sakai, S. Kinoshita, K. Tanaka und M. Fujisawa. Complicated urinary tract infection caused by *Pseudomonas aeruginosa* in a single institution (1999–2003). *Int J Urol.*, 13:538–42, 2006.
- RJ. Siehnel, C. Egli und RE. Hancock. Polyphosphate-selective porin OprO of *Pseudomonas aeruginosa*: expression, purification and sequence. *Mol Microbiol.*, 6:2319–26, 1992.
- AN. Simms und HL. Mobley. Multiple genes repress motility in uropathogenic *Escherichia coli* constitutively expressing type 1 fimbriae. *J Bacteriol.*, 190:3747–56, 2008.
- G. Singh, B. Wu, MS. Baek, A. Camargo, A. Nguyen, NA. Slusher, R. Srinivasan, JP. Wiener-Kronish und SV. Lynch. Secretion of *Pseudomonas aeruginosa* type III cytotoxins is dependent on pseudomonas quinolone signal concentration. *Microb Pathog.*, 49:196–203, 2010.
- T. Spilker, T. Coenye, P. Vandamme und JJ. LiPuma. PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol.*, 42:2074–2079, 2004.

- A. Spory, A. Bosserhoff, C. von Rhein, W. Goebel und A. Ludwig. Differential regulation of multiple proteins of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* by the transcriptional regulator SlyA. *J Bacteriol.*, 184:3549–59, 2002.
- R. Srikumar, T. Kon, N. Gotoh und K. Poole. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps MexA-MexB-OprM and MexC-MexD-OprJ in a multidrug-sensitive *Escherichia coli* strain. *Antimicrob Agents Chemother.*, 42:65–71, 1998.
- RY. Stanier, N.J. Palleroni und M. Doudoroff. The aerobic *pseudomonads*: a taxonomic study. *J Gen Microbiol.*, 43:159–271, 1966.
- MR. Stapleton, VA. Norte, RC. Read und J. Green. Interaction of the *Salmonella typhimurium* transcription and virulence factor SlyA with target DNA and identification of members of the SlyA regulon. *J Biol Chem.*, 277:17630–7, 2002.
- MA. Stepinska, E. Oldak und EA. Trafny. Proteolytic activity of *Pseudomonas aeruginosa* isolates with TTSS-mediated cytotoxicity and invasiveness to host cells. *Curr Microbiol.*, 60:360–4, 2010.
- PS. Stewart und JW. Costerton. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet.*, 358:135–8, 2001.
- V. Stewart, Y. Lu und AJ. Darwin. Periplasmic nitrate reductase (NapABC enzyme) supports anaerobic respiration by *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.*, 184:1314–23, 2002.
- D. J. Stickler. *Biofouling*, chapter Bacterial biofilms and the encrustation of urethral catheters, pages 94: 293 – 305. Taylor & Francis Group, 1996.
- CK. Stover, XQ. Pham, AL. Erwin, SD. Mizoguchi, P. Warrenner, MJ. Hickey, FS. Brinkman, WO. Hufnagle, DJ. Kowalik, M. Lagrou, RL. Garber, L. Goltry, E. Tolenino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, LL. Brody, SN. Coulter, KR. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, GK. Wong, Z. Wu, IT. Paulsen, J. Reizer, MH. Saier, RE. Hancock, S. Lory und MW. Olson. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406:947–948, 2000.
- C. Sundin, J. Thelaus, JE. Bröms und A. Forsberg. Polarisation of type III translocation by *Pseudomonas aeruginosa* requires PcrG, PcrV and PopN. *Microb Pathog.*, 37:313–22, 2004.

- S. Thoma. *Metabolismus und Antibiotikaresistenz von Pseudomonas aeruginosa unter simulierten Respirationstraktbedingungen*. PhD thesis, TU Braunschweig, 2009.
- NR. Thomson, A. Cox, BW. Bycroft, GS. Stewart, P. Williams und GP. Salmond. The rap and hor proteins of *Erwinia*, *Serratia* and *Yersinia*: a novel subgroup in a growing superfamily of proteins regulating diverse physiological processes in bacterial pathogens. *Mol Microbiol.*, 26:531–44, 1997.
- JL. Thudichum. Urochrome; the Colouring Matter of Urine. *Br Med J.*, 2:509–519, 1864.
- F. Tiburzi, F. Imperi und P. Visca. Intracellular levels and activity of PvdS, the major iron starvation sigma factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.*, 67:213–27, 2008.
- P. Tielen. *Einfluss extrazellulärer Enzyme auf die Struktur und die Eigenschaften von Biofilmen von Pseudomonas aeruginosa*. PhD thesis, Universität Duisburg-Essen, 2005.
- P. Tielen, M. Narten, N. Rosin, I. Biegler, I. Haddad, M. Hogardt, R. Neubauer, M. Schobert, L. Wiehlmann und D. Jahn. Genotypic and phenotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from urinary tract infections. *Int J Med Microbiol.*, 2010.
- WH. Traub, R. Scheidhauer, B. Leonhard und D. Bauer. Surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units: clusters of nosocomial cross-infection and encounter of a multiple-antibiotic resistant strain. *Chemotherapy.*, 44:243–259, 1998.
- C. Tricot, C. Van der Wauven, R. Wattiez, P. Falmagne und V. Stalon. Purification and properties of a succinyltransferase from *Pseudomonas aeruginosa* specific for both arginine and ornithine. *Eur J Biochem.*, 224:853–61, 1994.
- K. Trunk, B. Benkert, N. Quäck, R. Münch, M. Scheer, J. Garbe, L. Jänsch, M. Trost, J. Wehland, J. Buer, M. Jahn, M. Schobert und D. Jahn. Anaerobic adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: definition of the Anr and Dnr regulons. *Environ Microbiol.*, 12:1719–33, 2010.
- KH. Turner, I. Vallet-Gely und SL. Dove. Epigenetic control of virulence gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* by a LysR-type transcription regulator. *PLoS Genet.*, 5:e1000779, 2009.

- HG. Upritchard, J. Yang, P.J. Bremer, IL. Lamont und A.J. McQuillan. Adsorption to metal oxides of the *Pseudomonas aeruginosa* siderophore pyoverdine and implications for bacterial biofilm formation on metals. *Langmuir.*, 23:7189–95, 2007.
- I. Vallet, JW. Olson, S. Lory, A. Lazdunski und A. Filloux. The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene clusters (*cup*) and their involvement in biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 98:6911–6, 2001.
- I. Vallet, SP. Diggle, RE. Stacey, M. Cámara, I. Ventre, S. Lory, A. Lazdunski, P. Williams und A. Filloux. Biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*: fimbrial *cup* gene clusters are controlled by the transcriptional regulator MvaT. *J Bacteriol.*, 186: 2880–90, 2004.
- I. Vallet-Gely, JS. Sharp und SL. Dove. Local and global regulators linking anaerobiosis to *cupA* fimbrial gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.*, 189: 8667–76, 2007.
- NE. Van Alst, M. Wellington, VL. Clark, CG. Haidaris und BH. Iglewski. Nitrite reductase NirS is required for type III secretion system expression and virulence in the human monocyte cell line THP-1 by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun.*, 77:4446–54, 2009.
- C. Van Delden. *Pseudomonas: Virulence and Gene Regulation (Advances in Experimental Medicine & Biology)*, volume 2. Springer; 1 edition, 2004.
- C. Van Delden und BH. Iglewski. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis.*, 4:551–60, 1998.
- M. L. Vasil. *Phospholipases and Phospholipids. In: Pseudomonas*, volume 4. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, 2005.
- F. Von Götz, S. Häussler, D. Jordan, SS. Saravanamuthu, D. Wehmhöner, A. Strüßmann, J. Lauber, I. Attree, J. Buer, B. Tümmler und I. Steinmetz. Expression analysis of a highly adherent and cytotoxic small colony variant of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a lung of a patient with cystic fibrosis. *J Bacteriol.*, 186: 3837–47, 2004.
- MC. 3rd. Walters, F. Roe, A. Bugnicourt, MJ. Franklin und PS. Stewart. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance

- of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother.*, 47:317–23, 2003.
- BL. Wanner. Genes for phosphonate biodegradation in *Escherichia coli*. *SAAS Bull Biochem Biotechnol.*, 5:1–6, 1992.
- L. Wiehlmann, G. Wagner, N. Cramer, B. Siebert, P. Gudowius, G. Morales, T. Köhler, C. van Delden, C. Weinl, P. Slickers und B. Tümmler. Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 104:8101–6, 2007.
- HD. Williams, JE. Zlosnik und B. Ryall. Oxygen, cyanide and energy generation in the cystic fibrosis pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Adv Microb Physiol.*, 52:1–71, 2007.
- SA. Wilson und RE. Drew. Transcriptional analysis of the amidase operon from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.*, 177:3052–7, 1995.
- MK. Winson, S. Swift, L. Fish, JP. Throup, F. Jørgensen, SR. Chhabra, BW. Bycroft, P. Williams und GS. Stewart. Construction and analysis of *luxCDABE*-based plasmid sensors for investigating N-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing. *FEMS Microbiol Lett*, 163:185–192, Juno 1998.
- GL. Winsor, T. Van Rossum, R. Lo, B. Khaira, MD. Whiteside, RE. Hancock und FS. Brinkman. *Pseudomonas* genome database: facilitating user-friendly, comprehensive comparisons of microbial genomes. *Nucleic Acids Res.*, 37(Database issue):D483–8, 2009.
- H. Withers, S. Swift und P. Williams. Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in Gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol.*, 4: 186–93, 2001.
- DE. Woods, MS. Schaffer, HR. Rabin, GD. Campbell und PA. Sokol. Phenotypic comparison of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a variety of clinical sites. *J Clin Microbiol.*, 24:260–264, 1986.
- M. Wu, T. Guina, M. Brittnacher, H. Nguyen, J. Eng und SI. Miller. The *Pseudomonas aeruginosa* proteome during anaerobic growth. *J Bacteriol.*, 187:8185–8190, 2005.
- RY. Wu, RG. Zhang, O. Zagnitko, I. Dementieva, N. Maltzev, JD. Watson, R. Lasowski, P. Gornicki und A. Joachimiak. Crystal structure of *Enterococcus faecalis* SlyA-like transcriptional factor. *J Biol Chem.*, 278:20240–4, 2003.

- W. Wu und S. Jin. PtrB of *Pseudomonas aeruginosa* suppresses the type III secretion system under the stress of DNA damage. *J Bacteriol.*, 187:6058–68, 2005.
- D. Xia, D. Deng und S. Wang. Alterations of nitrate and nitrite content in saliva, serum, and urine in patients with salivary dysfunction. *J Oral Pathol Med.*, 32:95–9, 2003.
- TL. Yahr, J. Goranson und DW. Frank. Exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is secreted by a type III pathway. *Mol Microbiol.*, 22:991–1003, 1996.
- TL. Yahr, A.J. Vallis, MK. Hancock, JT. Barbieri und DW. Frank. ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 95:13899–904, 1998.
- WW. Yue, S. Grizot und SK. Buchanan. Structural evidence for iron-free citrate and ferric citrate binding to the TonB-dependent outer membrane transporter FecA. *J Mol Biol.*, 332:353–68, 2003.
- DY. Yum, YP. Lee und JG. Pan. Cloning and expression of a gene cluster encoding three subunits of membrane-bound gluconate dehydrogenase from *Erwinia cyprripedii* ATCC 29267 in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.*, 179:6566–72, 1997.
- L. H. Zhang. Quorum quenching and proactive host defense. *Trends Plant Sci.*, 8: 238–44, 2003.
- W. G. Zumft. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 61:533–616, 1997.

A Anhang

A.1 Transkriptom-Tabellen

Tabelle 40: Induzierte Gene auf AUM vs. 1:10 LB, aus Transkriptomanalysen von *P. aeruginosa* PAO1 Koloniebiofilmen unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen, anaerob.

Locus tag	Gene name	altGeneName	Product name	logRatio	Factor (2 ⁿ)
PA0122			conserved hypothetical protein	2,25	4,76
PA0193			hypothetical protein	2,86	7,24
PA0197			hypothetical protein	2,31	4,96
PA0198	<i>exbB1</i>		transport protein ExbB	2,58	5,99
PA0199	<i>exbD1</i>		transport protein ExbD	3,04	8,21
PA0299	<i>spuC</i>		putrescine aminotransferase	2,11	4,32
PA0399			cystathionine beta-synthase	2	3,99
PA0423	<i>pasP</i>	<i>ycel</i>	PasP	2,06	4,18
PA0433			hypothetical protein	2,14	4,41
PA0471		<i>fhuR</i>	probable transmembrane sensor	2,07	4,2
PA0472		<i>fhuI</i>	probable sigma-70 factor, ECF subfamily	2,1	4,28
PA0604			probable binding protein component of ABC transporter	2,16	4,48
PA0610	<i>prtN</i>		transcriptional regulator PrtN	2,03	4,09
PA0612	<i>ptrB</i>		repressor, PtrB	2,02	4,05
PA0632			hypothetical protein	2,11	4,31
PA0672	<i>hemO</i>	<i>pigA</i>	heme oxygenase	2,88	7,36
PA0707	<i>toxR</i>	<i>regA</i>	transcriptional regulator ToxR	2,89	7,4
PA0745			probable enoyl-CoA hydratase/isomerase	2,18	4,54
PA0751			conserved hypothetical protein	3,14	8,81
PA0752			conserved hypothetical protein	3,39	10,5
PA0753			hypothetical protein	3,34	10,1
PA0754			hypothetical protein	4,09	17,09
PA0755	<i>opdH</i>		cis-aconitate porin OpdH	3,22	9,33
PA0782	<i>putA</i>	<i>pruB;pruA</i>	proline dehydrogenase PutA	2,14	4,4
PA0783	<i>putP</i>		sodium/proline symporter PutP	2,04	4,11

Tabelle 40: Fortsetzung: Induzierte Gene, anaerob

PA0792	<i>prpD</i>		propionate catabolic protein PrpD	2,21	4,63
PA0807	<i>ampDh3</i>		AmpDh3	3,1	8,57
PA0865	<i>hpd</i>		4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	2,43	5,39
PA0870	<i>phhC</i>	<i>aspC;tyrB</i>	aromatic amino acid aminotransferase	2,06	4,16
PA0871	<i>phhB</i>		pterin-4- α -carbinolamine dehydratase	2,05	4,14
PA0887	<i>acsA</i>		acetyl-coenzyme A synthetase	2,68	6,4
PA0910			hypothetical protein	2,59	6,02
PA0911			hypothetical protein	2,03	4,09
PA1003	<i>mvfR</i>	<i>pqsR</i>	Transcriptional regulator MvfR	2,61	6,12
PA1074	<i>braC</i>		branched-chain amino acid transport protein BraC	2,01	4,02
PA1177	<i>napE</i>		periplasmic nitrate reductase protein NapE	2,31	4,95
PA1245		<i>aprX</i>	hypothetical protein	3,19	9,11
PA1249	<i>aprA</i>		alkaline metalloproteinase precursor	4,63	24,69
PA1300			probable sigma-70 factor, ECF subfamily	3,55	11,69
PA1301			probable transmembrane sensor	3,34	10,13
PA1342			probable binding protein component of ABC transporter	2,13	4,39
PA1507			probable transporter	2,52	5,73
PA1513			hypothetical protein	2,12	4,35
PA1517			conserved hypothetical protein	2,41	5,33
PA1518			conserved hypothetical protein	2,73	6,64
PA1746			hypothetical protein	2,88	7,35
PA1911			probable transmembrane sensor	2,76	6,79
PA1912			probable sigma-70 factor, ECF subfamily	3,31	9,94
PA1985	<i>pqqA</i>		pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein A	3,2	9,22
PA2007	<i>maiA</i>		maleylacetate isomerase	2,24	4,71
PA2033			hypothetical protein	4,38	20,89
PA2034			hypothetical protein	3,16	8,95

Tabelle 40: Fortsetzung: Induzierte Gene, anaerob

PA2062		probable pyridoxal-phosphate dependent enzyme	2,13	4,38
PA2083		probable ring-hydroxylating dioxygenase subunit	4,61	24,41
PA2084	<i>ycuB;asnB</i>	probable asparagine synthetase	2,35	5,1
PA2085		probable ring-hydroxylating dioxygenase small subunit	3,4	10,58
PA2086		probable epoxide hydrolase	3,17	9,01
PA2087		hypothetical protein	2,67	6,35
PA2088		hypothetical protein	3,68	12,79
PA2090		hypothetical protein	3,29	9,76
PA2092		probable major facilitator superfamily (MFS) transporter	2,89	7,39
PA2093		probable sigma-70 factor, ECF subfamily	2,65	6,28
PA2094		probable transmembrane sensor	2,5	5,67
PA2111		hypothetical protein	2,51	5,68
PA2112		conserved hypothetical protein	2,7	6,5
PA2113	<i>opdO</i>	pyroglutamate porin OpdO	2,43	5,38
PA2114		probable major facilitator superfamily (MFS) transporter	3,62	12,3
PA2116		conserved hypothetical protein	2,93	7,62
PA2146		conserved hypothetical protein	4,41	21,24
PA2190		conserved hypothetical protein	2,99	7,93
PA2384	<i>yciG</i>	hypothetical protein	3,96	15,55
PA2385		PvdQ	2,74	6,69
PA2386		L-ornithine N5-oxygenase	5,74	53,52
PA2389		conserved hypothetical protein	2,61	6,1
PA2392		PvdP	3,61	12,21
PA2393		probable dipeptidase precursor	4,43	21,5
PA2394	<i>pudN</i>	PvdN	4,13	17,45
PA2395	<i>pudO</i>	PvdO	3,14	8,83
PA2396	<i>pudF</i>	pyoverdine synthetase F	3,63	12,35

Tabelle 40: Fortsetzung: Induzierte Gene, anaerob

PA2397	<i>pvdE</i>		pyoverdine biosynthesis protein PvdE	3,89	14,79
PA2398	<i>fpaA</i>		ferripyoverdine receptor	4,79	27,64
PA2399	<i>pvdD</i>		pyoverdine synthetase D	2,85	7,22
PA2400	<i>pvdJ</i>	PA2401	PvdJ	2,72	6,59
PA2400	<i>pvdJ</i>	PA2401	PvdJ	3,02	8,11
PA2402			probable non-ribosomal peptide synthetase	3,49	11,27
PA2403			hypothetical protein	3,96	15,57
PA2404			hypothetical protein	3,61	12,2
PA2405			hypothetical protein	4,51	22,76
PA2406			hypothetical protein	3,24	9,48
PA2407			probable adhesion protein	2,67	6,38
PA2408			probable ATP-binding component of ABC transporter	2,21	4,63
PA2410			hypothetical protein	2,28	4,84
PA2411			probable thioesterase	5,42	42,78
PA2412			conserved hypothetical protein	6,13	70,23
PA2413	<i>pvdH</i>		L-2,4-diaminobutyrate:2-ketoglutarate 4-aminotransferase, PvdH	5,06	33,26
PA2424	<i>pvdL</i>		PvdL	3,74	13,32
PA2425	<i>pvdG</i>		PvdG	3,16	8,95
PA2426	<i>pvdS</i>		sigma factor PvdS	2,73	6,64
PA2427			hypothetical protein	2,28	4,85
PA2452			hypothetical protein	2,52	5,75
PA2468	<i>foxI</i>		ECF sigma factor FoxI	2,1	4,3
PA2679			hypothetical protein	2,11	4,31
PA2746			hypothetical protein	3,6	12,1
PA2862	<i>lipA</i>		lactonizing lipase precursor	3,14	8,83
PA2929			hypothetical protein	2,19	4,57
PA2937			hypothetical protein	2,21	4,64

Tabelle 40: Fortsetzung: Induzierte Gene, anaerob

PA3233			hypothetical protein	2,57	5,93
PA3234	<i>yjcG</i>		probable sodium:solute symporter	3,16	8,91
PA3235	<i>yjcH</i>		conserved hypothetical protein	2,97	7,84
PA3407	<i>hasAp</i>		heme acquisition protein HasAp	6	63,97
PA3408	<i>hasR</i>		Haem uptake outer membrane receptor HasR precursor	3,32	10
PA3410			probable sigma-70 factor, ECF subfamily	3,07	8,41
PA3441	<i>ssuF</i>		probable molybdopterin-binding protein	3,02	8,1
PA3520			hypothetical protein	2,45	5,46
PA3530	<i>bfd</i>		conserved hypothetical protein	2,33	5,03
PA3568	<i>ymmS</i>		probable acetyl-coa synthetase	2,54	5,83
PA3600	<i>rpl36</i>		conserved hypothetical protein	5	32,08
PA3601	<i>ykgM</i>		conserved hypothetical protein	4,66	25,36
PA3724	<i>lasB</i>		elastase LasB	2,25	4,77
PA3899			probable sigma-70 factor, ECF subfamily	2,83	7,12
PA3901	<i>fecA</i>		Fe(III) dicitrate transport protein FecA	4,09	17,08
PA3922			conserved hypothetical protein	3	7,98
PA3923			hypothetical protein	3,09	8,49
PA4023	<i>eutP</i>		probable transport protein	3,27	9,65
PA4024	<i>eutB</i>		ethanolamine ammonia-lyase large subunit	3,14	8,83
PA4025			probable ethanolamine ammonia-lyase light chain	2,19	4,57
PA4168	<i>fpoB</i>		second ferric pyoverdine receptor FpvB	2,33	5,04
PA4219	<i>yfpB</i>		hypothetical protein	2,19	4,58
PA4220	<i>fptB</i>		hypothetical protein	2	4,01
PA4222	<i>pchI</i>		probable ATP-binding component of ABC transporter	2,86	7,24
PA4223	<i>pchH</i>		probable ATP-binding component of ABC transporter	2,66	6,32
PA4224	<i>pchG</i>		pyochelin biosynthetic protein PchG	2,83	7,12
PA4225	<i>pchF</i>		pyochelin synthetase	3,15	8,89

Tabelle 40: Fortsetzung: Induzierte Gene, anaerob

PA4226	<i>pchE</i>	dihydroaeruginic acid synthetase	3,03	8,14
PA4227	<i>pchR</i>	transcriptional regulator PchR	2,17	4,48
PA4230	<i>pchB</i>	salicylate biosynthesis protein PchB	2,37	5,18
PA4290		probable chemotaxis transducer	2,85	7,19
PA4296	<i>pprB</i>	two-component response regulator, PprB	2,78	6,87
PA4467		hypothetical protein	3,62	12,28
PA4468	<i>sodM</i>	superoxide dismutase	4,31	19,81
PA4469		hypothetical protein	4,47	22,1
PA4470	<i>fumC1</i>	fumarate hydratase	4,24	18,92
PA4471		hypothetical protein	4,24	18,91
PA4500		probable binding protein component of ABC transporter	2,14	4,42
PA4507		hypothetical protein	2,96	7,79
PA4570		hypothetical protein	4,16	17,86
PA4573		hypothetical protein	2,01	4,04
PA4708	<i>phuT</i>	Heme-transport protein, PhuT	2,45	5,47
PA4709	<i>phuS</i>	probable hemin degrading factor	2,5	5,67
PA4710	<i>phuR</i>	Haem/Haemoglobin uptake outer membrane receptor PhuR precursor	2,36	5,14
PA4877		hypothetical protein	2,02	4,05
PA4895		probable transmembrane sensor	2,25	4,77
PA4896		probable sigma-70 factor, ECF subfamily	3,37	10,34
PA5100	<i>hutU</i>	urocanase	2,19	4,56
PA5217		probable binding protein component of ABC iron transporter	2,1	4,28
PA5312	<i>kauB</i>	probable aldehyde dehydrogenase	2,5	5,65
PA5352	<i>glcG</i>	conserved hypothetical protein	2,38	5,19
PA5353	<i>glcF</i>	glycolate oxidase subunit GlcF	2,19	4,56
PA5354	<i>glcE</i>	glycolate oxidase subunit GlcE	2,13	4,37

Tabelle 40: Fortsetzung: Induzierte Gene, anaerob

PA5355	<i>glcD</i>	glycolate oxidase subunit GlcD	2,29	4,89
PA5429	<i>aspA</i>	aspartate ammonia-lyase	2,36	5,15

Tabelle 41: Reprimierte Gene auf AUM vs. 1:10 LB, aus Transkriptomanalysen von *P. aeruginosa* PAO1 Koloniebiofilmen unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen, anaerob.

Locus tag	Gene name	altGeneName	Product name	logRatio	Factor (2 ⁿ)
PA0090			probable ClpA/B-type chaperone	-2,03	0,24
PA0091			conserved hypothetical protein	-2,21	0,22
PA0160			hypothetical protein	-2,64	0,16
PA0209		<i>mdcB</i>	conserved hypothetical protein	-2,03	0,25
PA0210	<i>mdcC</i>		malonate decarboxylase delta subunit	-2,65	0,16
PA0211	<i>mdcD</i>		malonate decarboxylase beta subunit	-2,18	0,22
PA0213		<i>mdcG</i>	hypothetical protein	-2,13	0,23
PA0214		<i>mdcH</i>	probable acyl transferase	-2,28	0,21
PA0347	<i>glpQ</i>		glycerophosphoryl diester phosphodiesterase, periplasmic	-2,67	0,16
PA0478			probable N-acetyltransferase	-2,09	0,24
PA0510		<i>nirE</i>	probable uroporphyrin-III c-methyltransferase	-2,13	0,23
PA0513		<i>nirG</i>	probable transcriptional regulator	-2,55	0,17
PA0515		<i>nirD</i>	probable transcriptional regulator	-2,57	0,17
PA0516	<i>nirF</i>		heme d1 biosynthesis protein NirF	-2,31	0,2
PA0517	<i>nirC</i>		probable c-type cytochrome precursor	-2,86	0,14
PA0518	<i>nirM</i>		cytochrome c-551 precursor	-3,01	0,12
PA0519	<i>nirS</i>		nitrite reductase precursor	-2,6	0,16
PA0523	<i>norC</i>		nitric-oxide reductase subunit C	-3,02	0,12
PA0524	<i>norB</i>		nitric-oxide reductase subunit B	-3,53	0,09
PA0525		<i>norD</i>	probable dinitrification protein NorD	-2,44	0,18

Tabelle 41: Fortsetzung: Reprimierte Gene, anaerob

PA0529		conserved hypothetical protein	-2,62	0,16
PA0530		probable class III pyridoxal phosphate-dependent aminotransferase	-2,2	0,22
		se		
PA0531		probable glutamine amidotransferase	-2,47	0,18
PA0654	<i>speD</i>	S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme	-2,29	0,2
PA0674	<i>pigC</i>	hypothetical protein	-3,36	0,1
PA0691		hypothetical protein	-2,33	0,2
PA0730		probable transferase	-2,31	0,2
PA0842		probable glycosyl transferase	-3,94	0,07
PA0874		hypothetical protein	-2,09	0,23
PA0915	<i>yehS</i>	conserved hypothetical protein	-2,09	0,24
PA1077	<i>flgB</i>	flagellar basal-body rod protein FlgB	-2,53	0,17
PA1078	<i>flgC</i>	flagellar basal-body rod protein FlgC	-2,21	0,22
PA1079	<i>flgD</i>	flagellar basal-body rod modification protein FlgD	-2,85	0,14
PA1080	<i>flgE</i>	flagellar hook protein FlgE	-2,67	0,16
PA1081	<i>flgF</i>	flagellar basal-body rod protein FlgF	-2,64	0,16
PA1086	<i>flgK</i>	flagellar hook-associated protein 1 FlgK	-2,43	0,19
PA1087	<i>flaK</i>	flagellar hook-associated protein type 3 FlgL	-2,15	0,23
PA1090		hypothetical protein	-2,02	0,25
PA1096		hypothetical protein	-2,14	0,23
PA1317	<i>cyoA</i>	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit II	-4,3	0,05
PA1318	<i>cyoB</i>	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit I	-3,41	0,09
PA1319	<i>cyoC</i>	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit III	-2,93	0,13
PA1409	<i>aphA</i>	acetylpyruvate aminohydrolase	-2,21	0,22
PA1471		hypothetical protein	-2,25	0,21
PA1606		hypothetical protein	-4,91	0,03
PA1608		probable chemotaxis transducer	-2,68	0,16

Tabelle 41: Fortsetzung: Reprimierte Gene, anaerob

PA1609	<i>fabB</i>		beta-ketoacyl-ACP synthase I	-2,33	0,2
PA1610	<i>fabA</i>		beta-hydroxydecanoyl-ACP dehydrase	-2,31	0,2
PA1776	<i>sigX</i>		ECF sigma factor SigX	-2,13	0,23
PA1844			hypothetical protein	-2,49	0,18
PA1845			hypothetical protein	-2,61	0,16
PA1863	<i>modA</i>		molybdate-binding periplasmic protein precursor ModA	-3,49	0,09
PA1864			probable transcriptional regulator	-2,33	0,2
PA1920		<i>nrdD</i>	conserved hypothetical protein	-3,13	0,11
PA1967			hypothetical protein	-2,19	0,22
PA2279	<i>arsC</i>		ArsC protein	-2,24	0,21
PA2306			conserved hypothetical protein	-2,63	0,16
PA2428			hypothetical protein	-4,96	0,03
PA2548			hypothetical protein	-2,35	0,2
PA2630		<i>ycfD</i>	conserved hypothetical protein	-2,05	0,24
PA2635			hypothetical protein	-3,22	0,11
PA2652			probable chemotaxis transducer	-2,75	0,15
PA2716			probable FMN oxidoreductase	-3,18	0,11
PA2717	<i>cpo</i>		chloroperoxidase precursor	-2,02	0,25
PA2719			hypothetical protein	-2,07	0,24
PA2788			probable chemotaxis transducer	-2,25	0,21
PA2803			hypothetical protein	-4,1	0,06
PA2804			hypothetical protein	-4,26	0,05
PA2840		<i>deaD</i>	probable ATP-dependent RNA helicase	-3,67	0,08
PA2867			probable chemotaxis transducer	-2,01	0,25
PA2881			probable two-component response regulator	-2,97	0,13
PA2882			probable two-component sensor	-2,66	0,16
PA2967	<i>fabG</i>		3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase	-2,27	0,21

Tabelle 41: Fortsetzung: Reprimierte Gene, anaerob

PA2968	<i>fabD</i>	malonyl-CoA-[acyl-carrier-protein] transacylase	-3,26	0,1
PA3205		hypothetical protein	-3,01	0,12
PA3219		hypothetical protein	-2,85	0,14
PA3250		hypothetical protein	-3,6	0,08
PA3251		hypothetical protein	-2,97	0,13
PA3253		probable permease of ABC transporter	-2,24	0,21
PA3254		probable ATP-binding component of ABC transporter	-2,25	0,21
PA3258		hypothetical protein	-3,31	0,1
PA3280	<i>oprO</i>	Pyrophosphate-specific outer membrane porin OprO precursor	-6,27	0,01
PA3296	<i>phoA</i>	alkaline phosphatase	-4,44	0,05
PA3319	<i>plcN</i>	non-hemolytic phospholipase C precursor	-2,36	0,19
PA3368		probable acetyltransferase	-2,96	0,13
PA3369		hypothetical protein	-2,12	0,23
PA3377	<i>phnJ</i>	conserved hypothetical protein	-3,16	0,11
PA3378	<i>phnI</i>	conserved hypothetical protein	-2,98	0,13
PA3379	<i>phnH</i>	conserved hypothetical protein	-2,49	0,18
PA3380	<i>phnG</i>	conserved hypothetical protein	-2,79	0,14
PA3381	<i>phnF</i>	probable transcriptional regulator	-3,19	0,11
PA3382	<i>phnE</i>	phosphonate transport protein PhnE	-2,14	0,23
PA3383		binding protein component of ABC phosphonate transporter	-4,46	0,05
PA3384	<i>phnC</i>	ATP-binding component of ABC phosphonate transporter	-2,71	0,15
PA3391	<i>nosR</i>	regulatory protein NosR	-2,2	0,22
PA3392	<i>nosZ</i>	nitrous-oxide reductase precursor	-3,46	0,09
PA3393	<i>nosD</i>	NosD protein	-2,23	0,21
PA3394	<i>nosF</i>	NosF protein	-2,28	0,21
PA3526		probable outer membrane protein precursor	-2,48	0,18
PA3584	<i>glpD</i>	glycerol-3-phosphate dehydrogenase	-3,3	0,1

Tabelle 41: Fortsetzung: Reprimierte Gene, anaerob

PA3602	<i>yerD</i>	conserved hypothetical protein	-2,2	0,22
PA3661		hypothetical protein	-2,75	0,15
PA3741		hypothetical protein	-2,07	0,24
PA3872	<i>narI</i>	respiratory nitrate reductase gamma chain	-2,42	0,19
PA3873	<i>narJ</i>	respiratory nitrate reductase delta chain	-2,23	0,21
PA3874	<i>narH</i>	respiratory nitrate reductase beta chain	-2,95	0,13
PA3875	<i>narG</i>	respiratory nitrate reductase alpha chain	-2,78	0,15
PA3877	<i>narK1</i>	nitrite extrusion protein 1	-2,1	0,23
PA3880		conserved hypothetical protein	-2,11	0,23
PA3909		hypothetical protein	-2,61	0,16
PA3910		hypothetical protein	-2,83	0,14
PA3911	<i>yhbT</i>	conserved hypothetical protein	-2,49	0,18
PA3913		probable protease	-2,91	0,13
PA3914	<i>moeA1</i>	molybdenum cofactor biosynthetic protein A1	-2,66	0,16
PA3915	<i>moeB1</i>	molybdopterin biosynthetic protein B1	-4,31	0,05
PA3918	<i>moeC</i>	molybdopterin biosynthetic protein C	-2,05	0,24
PA3928		hypothetical protein	-2,44	0,18
PA3930	<i>cioA</i>	cyanide insensitive terminal oxidase	-2,83	0,14
PA4129		hypothetical protein	-2,54	0,17
PA4130		probable sulfite or nitrite reductase	-2,54	0,17
PA4131		probable iron-sulfur protein	-3,44	0,09
PA4132		conserved hypothetical protein	-2,54	0,17
PA4133	<i>ccoN; fixN; cytN</i>	cytochrome c oxidase subunit (cbb3-type)	-3,27	0,1
PA4139		hypothetical protein	-3,28	0,1
PA4309	<i>pctA</i>	chemotactic transducer PctA	-2,52	0,17
PA4310	<i>pctB</i>	chemotactic transducer PctB	-2,58	0,17
PA4326		hypothetical protein	-2,25	0,21

Tabelle 41: Fortsetzung: Reprimierte Gene, anaerob

PA4350		conserved hypothetical protein	-4,22	0,05
PA4351		probable acyltransferase	-4,29	0,05
PA4429		probable cytochrome c1 precursor	-2,02	0,25
PA4519	<i>speC</i>	ornithine decarboxylase	-2,15	0,23
PA4602	<i>glyA3</i>	serine hydroxymethyltransferase	-2,29	0,2
PA4673	<i>ychF</i>	conserved hypothetical protein	-2,34	0,2
PA4696	<i>ilvI</i>	acetolactate synthase large subunit	-2,3	0,2
PA4844		probable chemotaxis transducer	-2,48	0,18
PA5035	<i>gltD</i>	glutamate synthase small chain	-2,22	0,22
PA5117	<i>typA</i>	regulatory protein TypA	-2,74	0,15
PA5174	<i>aspB</i>	probable beta-ketoacyl synthase	-2,78	0,15
PA5248	<i>bipA</i>	hypothetical protein	-2,1	0,23
PA5360	<i>phoB</i>	two-component response regulator PhoB	-4,85	0,03
PA5361	<i>phoR</i>	two-component sensor PhoR	-4,31	0,05
PA5365	<i>phoU</i>	phosphate uptake regulatory protein PhoU	-3,66	0,08
PA5366	<i>pstB</i>	ATP-binding component of ABC phosphate transporter	-4,69	0,04
PA5367	<i>pstA</i>	membrane protein component of ABC phosphate transporter	-4,77	0,04
PA5368	<i>pstC</i>	membrane protein component of ABC phosphate transporter	-4,64	0,04
PA5369	<i>pstS</i>	phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding protein, PstS	-5,01	0,03
PA5446		hypothetical protein	-4,07	0,06
PA5460		hypothetical protein	-2,84	0,14
PA5549	<i>glmS</i>	glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase	-2,66	0,16

Tabelle 42: Induzierte Gene auf AUM vs. 1:10 LB, aus Transkriptomanalysen von *P. aeruginosa* PAO1 Koloniebiofilmen unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen, aerob.

Locus tag	Gene name	altGeneName	Product name	logRatio	Factor (2 ⁿ)
PA0476			probable permease	2,2	4,59
PA0672	<i>hemO</i>	<i>pigA</i> ;	heme oxygenase	3,96	15,56248
PA0707	<i>toxR</i>	<i>regA</i> ;	transcriptional regulator ToxR	2,58	5,99
PA0751	<i>AmoA</i>		conserved hypothetical protein	2,59	6,03
PA0752	<i>tctA</i>		conserved hypothetical protein	3,45	10,9
PA0753	<i>tctB</i>		hypothetical protein	3,29	9,75
PA0754	<i>tctC</i>		hypothetical protein	3,73	13,29
PA0755	<i>opdH</i>		cis-aconitate porin OpdH	4,4	21,15
PA0996	<i>pqsA</i>		probable coenzyme A ligase	2,17	4,5
PA0997	<i>pqsB</i>		Homologous to beta-keto-acyl-acyl-carrier protein synthase	2,27	4,83
PA0998	<i>pqsC</i>		Homologous to beta-keto-acyl-acyl-carrier protein synthase	2,33	5,03
PA0999	<i>pqsD</i>	<i>fabH1</i>	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase III	2,07	4,19
PA1000	<i>pqsE</i>		Quinolone signal response protein	2,06	4,17
PA1001	<i>phnA</i>		anthranilate synthase component I	2,4	5,28
PA1002	<i>phnB</i>		anthranilate synthase component II	2,14	4,41
PA1178	<i>oprH</i>		PhoP/Q and low Mg ²⁺ inducible outer membrane protein H1 precursor	2,59	6,02
PA1300			probable sigma-70 factor, ECF subfamily	4,14	17,66
PA1301			probable transmembrane sensor	3,53	11,59
PA1911			probable transmembrane sensor	2,11	4,33
PA1912			probable sigma-70 factor, ECF subfamily	2,37	5,18
PA2033			hypothetical protein	5,11	34,63
PA2034			hypothetical protein	3,81	14,02
PA2193	<i>hcnA</i>		hydrogen cyanide synthase HcnA	2,22	4,65
PA2384			hypothetical protein	4,02	16,23

Tabelle 42: Fortsetzung: Induzierte Gene, aerob

PA2385	<i>pvdQ</i>	PvdQ	2,92	7,57
PA2386	<i>pvdA</i>	L-ornithine N5-oxygenase	4,13	17,53
PA2389		conserved hypothetical protein	2,34	5,05
PA2392	<i>pvdP</i>	PvdP	2,88	7,38
PA2393		probable dipeptidase precursor	3,7	12,99
PA2394	<i>pvdN</i>	PvdN	3,43	10,8
PA2395	<i>pvdO</i>	PvdO	2,96	7,8
PA2396	<i>pvdF</i>	pyoverdine synthetase F	2,61	6,1
PA2397	<i>pvdE</i>	pyoverdine biosynthesis protein PvdE	3,11	8,65
PA2398	<i>fpvA</i>	ferripyoverdine receptor	2,92	7,58
PA2399	<i>pvdD</i>	pyoverdine synthetase D	2,8	6,95
PA2400	<i>pvdJ</i>	PvdJ	3	8
PA2401	<i>pvdJ</i>	PvdJ	3,23	9,4
PA2402		probable non-ribosomal peptide synthetase		3,4
PA2405		hypothetical protein	2,22	4,66
PA2411		probable thioesterase	3,59	12,04
PA2412		conserved hypothetical protein	4,46	21,96
PA2413	<i>pvdH</i>	L-2,4-diaminobutyrate:2-ketoglutarate 4-aminotransferase, PvdH	3,37	10,35
PA2424	<i>pvdL</i>	PvdL	3,71	13,06
PA2425	<i>pvdG</i>	PvdG	3,11	8,61
PA2426	<i>pvdS</i>	sigma factor PvdS	4,02	16,22
PA2427		hypothetical protein	4,75	26,87
PA2452		hypothetical protein	2,28	4,86
PA2531		probable aminotransferase	2,99	7,94
PA3410		probable sigma-70 factor, ECF subfamily	2,03	4,08
PA3600	<i>rpl36</i>	conserved hypothetical protein, ribosomales Protein 36, large SU	2,72	6,61
PA3601	<i>ykgM</i>	conserved hypothetical protein, Ribosomal protein L31	2,48	5,59

Tabelle 42: Fortsetzung: Induzierte Gene, aerob

PA3899		probable sigma-70 factor, ECF subfamily	2,13	4,39
PA4078		probable nonribosomal peptide synthetase	3,03	8,15
PA4217	<i>phzS</i>	flavin-containing monooxygenase	2,52	5,75
PA4227	<i>pchR</i>	transcriptional regulator PchR	3,67	12,69
PA4467		hypothetical protein	4,22	18,62
PA4468	<i>sodM</i>	superoxide dismutase	5,67	50,99
PA4469		hypothetical protein	5,89	59,18
PA4470	<i>fumC1</i>	fumarate hydratase	6,13	69,99
PA4471		hypothetical protein	6,36	82,19
PA4507	<i>fagA</i>	hypothetical protein	2,4	5,26
PA4570		hypothetical protein	4,86	29,01
PA4708	<i>phuT</i>	Heme-transport protein, PhuT	2,31	4,97
PA4709	<i>phuS</i>	probable heme degrading factor	2,13	4,38
PA4710	<i>phuR</i>	Haem/Haemoglobin uptake outer membrane receptor PhuR pre-cursor	2,45	5,48
PA4896		probable sigma-70 factor, ECF subfamily	3,1	8,56

Tabelle 43: Reprimierte Gene auf AUM vs. 1:10 LB, aus Transkriptomanalysen von *P. aeruginosa* PAO1 Koloniebiofilmen unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen, aerob.

Locus tag	Gene name	altGeneName	Product name	logRatio	Factor (2 ⁿ)
PA0007			hypothetical protein	-2,07	0,24
PA0007			hypothetical protein	-2,07	0,24
PA0441	<i>dhb</i>	<i>hyuA</i>	dihydropyrimidinase	-2,22	0,22
PA1172	<i>napC</i>		cytochrome c-type protein NapC	-2,7	0,15
PA1173	<i>napB</i>		cytochrome c-type protein NapB precursor	-2,91	0,13
PA1174	<i>napA</i>		periplasmic nitrate reductase protein NapA	-2,68	0,16

Tabelle 43: Fortsetzung: Reprimierte Gene, aerob

PA1435	<i>qscR</i>	<i>phzR</i>	probable Resistance-Nodulation-Cell Division (RND) efflux mem- brane fusion protein precursor	-2,23	0,21
PA1891			hypothetical protein	-2,52	0,17
PA1892			hypothetical protein	-3,3	0,1
PA1893			hypothetical protein	-2,57	0,17
PA1894			hypothetical protein	-2,86	0,14
PA1895			hypothetical protein	-3,08	0,12
PA1896			hypothetical protein	-3,22	0,11
PA1897			hypothetical protein	-3,32	0,1
PA1898	<i>qscR</i>	<i>phzR</i>	quorum-sensing control repressor	-2,25	0,21
PA1914		<i>hem</i>	conserved hypothetical protein	-2,39	0,19
PA2505	<i>opdT</i>	<i>oprD3</i>	tyrosine porin OpdT	-2,19	0,22
PA2506			hypothetical protein	-4,4	0,05
PA2507	<i>catA</i>		catechol 1,2-dioxygenase	-3,59	0,08
PA2508	<i>catC</i>		muconolactone delta-isomerase	-3,22	0,11
PA2509	<i>catB</i>		muconate cycloisomerase I	-2,51	0,18
PA2511			probable transcriptional regulator	-3,55	0,09
PA2512	<i>antA</i>		anthranilate dioxygenase large subunit	-3,5	0,09
PA2513	<i>antB</i>		anthranilate dioxygenase small subunit	-3,59	0,08
PA2514	<i>antC</i>		anthranilate dioxygenase reductase	-3,98	0,06
PA2682			conserved hypothetical protein	-3,47	0,09
PA2808	<i>ptrA</i>		two-component response repressor, PtrA	-2,28	0,21
PA3032	<i>snr1</i>		cytochrome c Snr1	-2,42	0,19
PA3363	<i>amiR</i>		aliphatic amidase regulator	-2,6	0,16
PA3364	<i>amiC</i>		aliphatic amidase expression-regulating protein	-2,71	0,15
PA3365		<i>amiB</i>	probable chaperone	-2,95	0,13
PA3366	<i>amiE</i>		aliphatic amidase	-3,11	0,12

Tabelle 43: Fortsetzung: Reprimierte Gene, aerob

PA4498			probable metalloproteinase	-2,14	0,23
PA4504		<i>dppC</i>	probable permease of ABC transporter	-2,05	0,24
PA5410	<i>ghcA</i>		probable ring hydroxylating dioxygenase, alpha-subunit	-2,25	0,21

Tabelle 44: Induzierte Gene von *P. aeruginosa* PAO1 Ü_ *slgA*, exponentielle Phase, LB, 25 °C, aerob.

Locus tag	Gene name	altGeneName	Product name	logRatio	Factor (2 ⁿ)
PA0086			hypothetical protein	1,06	2,08
PA0086			hypothetical protein	1,06	2,08
PA0087			hypothetical protein	1,22	2,33
PA0088			hypothetical protein	1,11	2,16
PA0252			hypothetical protein	1	2
PA0433			hypothetical protein	1,04	2,06
PA0887	<i>acsA</i>		acetyl-coenzyme A synthetase	2,44	5,44
PA1540			conserved hypothetical protein	0,98	1,97
PA2247	<i>bkdA1</i>		2-oxoisovalerate dehydrogenase (alpha subunit)	1,03	2,04
PA2264			conserved hypothetical protein	1,7	3,24
PA2265		<i>gad</i>	gluconate dehydrogenase	2,1	4,29
PA2266			probable cytochrome c precursor	1,84	3,58
PA2322		<i>gntU;gntT;gntV</i>	gluconate permease	1,24	2,37
PA2398	<i>fpvA</i>		ferritinoverdine receptor	2,87	7,33
PA2403			hypothetical protein	1,45	2,73
PA2404			hypothetical protein	1,76	3,39
PA2405			hypothetical protein	1,86	3,64
PA2407			probable adhesion protein	1,92	3,79
PA2408			probable ATP-binding component of ABC transporter	1,66	3,17

Tabelle 44: Fortsetzung: Induzierte Gene PAO1 $\ddot{U}_{_slyA}$

PA2409		probable permease of ABC transporter	1,47	2,78
PA2410		hypothetical protein	1,24	2,37
PA3038	<i>opdQ</i>	probable porin	1,37	2,58
PA3181	<i>edaA</i>	2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase	1,72	3,29
PA3182	<i>pgl</i>	6-phosphogluconolactonase	1,7	3,25
PA3183	<i>zvf</i>	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	1,58	3
PA3195	<i>gapA</i>	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	1,12	2,17
PA3602	<i>yerD</i>	conserved hypothetical protein	2,08	4,24
PA3785		conserved hypothetical protein	0,99	1,99
PA4218		probable transporter	2,45	5,47
PA4219	<i>yfpB</i>	hypothetical protein	1,66	3,16
PA4220	<i>fptB</i>	hypothetical protein	3,62	12,27
PA4221	<i>fptA</i>	Fe(III)-pyochelin outer membrane receptor precursor	3,26	9,57
PA4223	<i>pchH</i>	probable ATP-binding component of ABC transporter	1,05	2,07
PA4224	<i>pchG</i>	pyochelin biosynthetic protein PchG	1,03	2,04
PA4226	<i>pchE</i>	dihydroaeruginosic acid synthetase	1,71	3,27
PA4228	<i>pchD</i>	pyochelin biosynthesis protein PchD	1,05	2,08
PA4229	<i>pchC</i>	pyochelin biosynthetic protein PchC	1,06	2,09
PA4230	<i>pchB</i>	salicylate biosynthesis protein PchB	0,99	1,99
PA4770	<i>lctP</i>	L-lactate permease	1,2	2,3
PA4889		probable oxidoreductase	1,01	2,02
PA5445	<i>psecoA</i>	probable coenzyme A transferase	1,25	2,38

Tabelle 45: Reprimierte Gene von *P. aeruginosa* PAO1 $\ddot{U}_{_slyA}$, exponentielle Phase, LB, 25 °C, aerob.

Locus tag	Gene name	altGeneName	Product name	logRatio	Factor (2^n)
-----------	-----------	-------------	--------------	----------	------------------

Tabelle 45: Fortsetzung: Reprimierte Gene PAO1 Ü_ *slyA*

ig_1427453_1428080			-1,23	0,42
ig_517462_518083			-1,66	0,32
PA0141		conserved hypothetical protein	-3,31	0,10
PA0141		conserved hypothetical protein	-3,31	0,1
PA0160		hypothetical protein	-1,44	0,37
PA0161		hypothetical protein	-1,11	0,46
PA0200		hypothetical protein	-4,01	0,06
PA0201		hypothetical protein	-2,42	0,19
PA0263	<i>hcpC</i>	secreted protein Hcp	-1,09	0,47
PA0295		probable periplasmic polyamine binding protein	-1,1	0,47
PA0519	<i>nirS</i>	nitrite reductase precursor	-2,46	0,18
PA0526		hypothetical protein	-2,25	0,21
PA0527	<i>dnr</i>	transcriptional regulator Dnr	-3,64	0,08
PA0529		conserved hypothetical protein	-2,22	0,21
PA0713		hypothetical protein	-1,11	0,46
PA0836	<i>ackA</i>	acetate kinase	-2,06	0,24
PA1076		hypothetical protein	-2,39	0,19
PA1196		probable transcriptional regulator	-2,96	0,13
PA1202	<i>ycaC</i>	probable hydrolase	-2,25	0,21
PA1317	<i>cyoA</i>	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit II	-0,96	0,51
PA1318	<i>cyoB</i>	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit I	-1,1	0,47
PA1319	<i>cyoC</i>	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit III	-1,24	0,42
PA1320	<i>cyoD</i>	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit IV	-1,09	0,47
PA1414		hypothetical protein	-2,81	0,14
PA1429		probable cation-transporting P-type ATPase	-1,15	0,45
PA1546	<i>hemN</i>	oxygen-independent coproporphyrinogen III oxidase	-2,99	0,13
PA1555	<i>ccoP; fixP</i>	probable cytochrome c	-1,64	0,32

Tabelle 45: Fortsetzung: Reprimierte Gene PAO1 Ü_ *slgA*

PA1556		<i>ccoO;fixO</i>	probable cytochrome c oxidase subunit	-2,73	0,15
PA1557		<i>ccoN;fixN;cytN</i>	probable cytochrome oxidase subunit (cbb3-type)	-3,06	0,12
PA1647			probable sulfate transporter	-1,32	0,4
PA1673			hypothetical protein	-4,38	0,05
PA1746			hypothetical protein	-2,59	0,17
PA1789			hypothetical protein	-2,78	0,15
PA1946	<i>rhsB</i>		binding protein component precursor of ABC ribose transporter	-0,97	0,51
PA2119		<i>adh</i>	alcohol dehydrogenase (Zn-dependent)	-3,19	0,11
PA2127			conserved hypothetical protein	-1,38	0,39
PA2128	<i>cupA1</i>		fimbrial subunit CupA1	-2,7	0,15
PA2129	<i>cupA2</i>		chaperone CupA2	-2,09	0,23
PA2132	<i>cupA5</i>		chaperone CupA5	-1,03	0,49
PA2193	<i>hcnA</i>		hydrogen cyanide synthase HcnA	-1,8	0,29
PA2381			hypothetical protein	-0,99	0,51
PA2432			probable transcriptional regulator	-2,36	0,19
PA2501			hypothetical protein	-3,05	0,12
PA2753			hypothetical protein	-2,79	0,14
PA2754			conserved hypothetical protein	-2,18	0,22
PA2805			hypothetical protein	-1,29	0,41
PA2867			probable chemotaxis transducer	-1,18	0,44
PA3006	<i>psrA</i>		transcriptional regulator PsrA	-1,09	0,47
PA3018			hypothetical protein	-1,28	0,41
PA3278			hypothetical protein	-3,55	0,09
PA3309		<i>uspK</i>	conserved hypothetical protein	-3,17	0,11
PA3337	<i>rfaD</i>		ADP-L-glycero-D-mannoheptose 6-epimerase	-2,89	0,13
PA3341			probable transcriptional regulator	-4,24	0,05
PA3342			hypothetical protein	-0,99	0,5

Tabelle 45: Fortsetzung: Reprimierte Gene PAO1 Ü_ *slrA*

PA3431	<i>ywbG</i>	conserved hypothetical protein	-0,98	0,51
PA3458		probable transcriptional regulator	-1,21	0,43
PA3465	<i>yfiS</i>	conserved hypothetical protein	-1,06	0,48
PA3572		hypothetical protein	-4	0,06
PA3613		hypothetical protein	-0,96	0,51
PA3614		hypothetical protein	-1,7	0,31
PA3839	<i>yfbS</i>	probable sodium:sulfate symporter	-1,22	0,43
PA3859		carboxylesterase	-0,98	0,51
PA3879	<i>narL</i>	two-component response regulator NarL	-1,8	0,29
PA3880		conserved hypothetical protein	-4,17	0,06
PA3913	<i>yhbU</i>	probable protease	-1,23	0,43
PA4067	<i>oprG</i>	Outer membrane protein OprG precursor	-1,91	0,27
PA4129		hypothetical protein	-2,02	0,25
PA4130		probable sulfite or nitrite reductase	-2,52	0,17
PA4131		probable iron-sulfur protein	-3,44	0,09
PA4132		conserved hypothetical protein	-2,32	0,2
PA4133	<i>ccoN;fatN;cydN</i>	cytochrome c oxidase subunit (cbb3-type)	-3,89	0,07
PA4134		hypothetical protein	-1,85	0,28
PA4235	<i>bfrA</i>	bacterioferritin	-1,31	0,4
PA4328		hypothetical protein	-3,25	0,11
PA4348		conserved hypothetical protein	-3,48	0,09
PA4352		conserved hypothetical protein	-2,54	0,17
PA4358		probable ferrous iron transport protein	-1,05	0,48
PA4359	<i>feoA</i>	conserved hypothetical protein	-1,41	0,38
PA4493		probable two-component response regulator	-1,02	0,49
PA4494		probable two-component sensor	-1,28	0,41
PA4571		probable cytochrome c	-2,05	0,24

Tabelle 45: Fortsetzung: Reprimierte Gene PAO1 Ü_ *slgA*

PA4577			hypothetical protein	-4,08	0,06
PA4587	<i>ccpR</i>		cytochrome c551 peroxidase precursor	-2,69	0,16
PA4596			probable transcriptional regulator	-1,72	0,3
PA4610			hypothetical protein	-2,34	0,2
PA4611			hypothetical protein	-3,83	0,07
PA4738		<i>yjbJ</i>	conserved hypothetical protein	-1,19	0,44
PA4739			conserved hypothetical protein	-1,71	0,3
PA4918			hypothetical protein	-1,91	0,27
PA4919	<i>pncB1</i>		nicotinate phosphoribosyltransferase	-1,16	0,45
PA4922	<i>azu</i>		azurin precursor	-1,59	0,33
PA5027			hypothetical protein	-2,43	0,19
PA5170	<i>arcD</i>		arginine/ornithine antiporter	-3,38	0,1
PA5171	<i>arcA</i>		arginine deiminase	-1,62	0,33
PA5180		<i>fdhD</i>	conserved hypothetical protein	-1,91	0,27
PA5208			conserved hypothetical protein	-3,06	0,12
PA5232		<i>yhiI</i>	conserved hypothetical protein	-1,8	0,29
PA5427	<i>adhA</i>		alcohol dehydrogenase	-3,38	0,1
PA5440		<i>yegQ</i>	probable peptidase	-1,27	0,41
PA5446			hypothetical protein	-0,96	0,51
PA5475			hypothetical protein	-3,67	0,08
PA5481			hypothetical protein	-1,66	0,32
PA5482			hypothetical protein	-2,28	0,21
PA5494			hypothetical protein	-1,05	0,48
PA5497	<i>nrdJa</i>		NrdJa	-1,23	0,43

Internetadressen

<http://www.pseudomonas.com>

<http://www.systomonas.de>

<http://www.kegg.com>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

<http://www.prodoric.de>

<http://www.prodoric.de/prodonet>

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dieter Jahn danke ich für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können und für die Übernahme des Gutachtens.

Herrn PD Dr. Ing. Max Schobert danke ich ebenfalls für die Übernahme des Gutachtens, sowie für die vielen kritischen Diskussionen zu meinem Thema und dafür, dass er immer einen „Plan B“ parat hatte.

Herrn Professor Dr. Ralf-R. Mendel danke ich vielmals für die Übernahme des Vorsitzes meiner Prüfungskommission.

Bei Dr. Petra Tielen möchte ich mich für die ausgezeichnete Betreuung und ihren unermüdlichen Optimismus während meiner Doktorarbeit bedanken. Sie hat mir gezeigt, was man braucht, um ein guter Wissenschaftler zu werden.

Meinen Kollegen Maike Narten, Tanja Piekarski, Sebastian Lars, Claudia Frädrich, Anja Hartmann, Annika Steen und Andrea Wesche danke ich für die allzeit vorhandene Hilfsbereitschaft und die prima Atmosphäre innerhalb und außerhalb des Labors.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Dr. Maurice Scheer für die gute Zusammenarbeit bei der Auswertung der Affymetrix GeneChip®.

Großer Dank geht an den gesamten AK Jahn für die nette Zusammenarbeit und für themenübergreifende Diskussionen.

Meinen Eltern Rita und Axel Rosner, sowie meiner gesamten Familie danke ich für die immerwährende Unterstützung und die Kraft, einfach alles meistern zu können.

Als letztes möchte ich mich bei der wichtigsten Person in meinem Leben bedanken, meinem Mann Moritz Rosin, der mich zu jeder Zeit verständnisvoll unterstützt, beflügelt und aufgefangen hat.

curriculum vitæ

Persönliche Daten

Name	Nathalie Yvonne Rosin, geb. Rosner
Geboren am	24. März 1983 in Wolfenbüttel
Familienstand	verheiratet, keine Kinder
Staatsbürgerschaft	deutsch

Schule und Studium

10/2007 - heute	Promotion am Institut für Mikrobiologie an der Technischen Universität Braunschweig Thema: Physiologie von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen
11/2006 - 08/2007	Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie an der Technischen Universität Braunschweig Thema: Etablierung von <i>in vitro</i> Harnwegs-Infektions-Modellen mit <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 und PA14 als Modellorganismen
10/2002 - 08/2007	Diplomstudium der Biologie an der Technischen Universität Braunschweig, Abschluss: Diplom Studienfächer im Hauptstudium: Zellbiologie Mikrobiologie Genetik
09/1995 - 06/2002	Lessinggymnasium Wenden, Braunschweig, Abschluss: Abitur
09/1993 - 07/1995	Orientierungsstufe Wenden, Braunschweig
08/1989 - 07/1993	Grundschule Wenden, Braunschweig